

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année 1961 - N° 195

CULTURE DU VIRUS GRIPPAL SUR CELLULES EPITHELIALES DE REIN DE VEAU EN COUCHES MONOCELLULAIRES

I . ADAPTATION DE LA SOUCHE APR 8

Travail du Laboratoire de Virologie
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes
(Médecin Lieutenant-Colonel MAITRE, chef de laboratoire)

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ MIXTE
DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON
ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 25 OCTOBRE 1961
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Bernard QUAGLINO

*Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire
né le 29 février 1936 à GRENOBLE (Isère)*

IMPRIMERIE ROUDIL FRÈRES - 3, Quai André-Lassagne, LYON

CULTURE DU VIRUS GRIPPAL
SUR CELLULES EPITHELIALES DE REIN DE VEAU
EN COUCHES MONOCELLULAIRES

I - ADAPTATION DE LA SOUCHE APR 8

Personnel de la Faculté

M. J. LEPINE, Doyen Honoraire

M. H. HERMANN, Doyen,
Correspondant de l'Institut

M. M. LEVRAT, Assesseur

Professeurs Honoraires

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY.

Professeurs

MM. HERMANN	Physiologie
CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (déta- ché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-Psychiatrique et Hygiène Mentale
ROCHET	Thérapeutique Chirurgicale et Chirurgie Opératoire
CHAMBON	Chimie Organique et Toxicologie
WERTHEIMER	Clinique Chirurgicale B
PAUPERT-RAVAULT	Clinique Médicale B
FROMENT	Clinique et Prophylaxie Cardio-Vasculaires
CROIZAT	Clinique Médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique Chirurgicale A
GUILLEMINET	Clinique de Chirurgie Orthopédique et de Chirurgie Infantile
REVOL	Pharmacie Galénique et Matière Médicale
POLLOSSON	Clinique Gynécologique
PIGEAUD	Clinique Obstétricale
BOURRET	Médecine du Travail
LEVRAT	Clinique Médicale A
SOHIER	Hygiène et Action sanitaire et sociale
DUCLOS	Clinique Stomatologique
BERNHEIM	Clinique Médicale infantile et Hygiène du premier âge
JOURDAN	Biologie médicale et Pharmacodynamie
NETIEN	Botanique et Cryptogamie
BERTRAND	Clinique Chirurgicale C
BADINAND	Chimie Analytique Pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
ROCHE	Médecine Légale et Déontologie
COUDERT	Parasitologie et Pathologie Exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'Audio-Phonologie
PAUFIQUE	Clinique Ophthalmologique
THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
BRUN	Clinique de Pneumo-Phtisiologie
CREYSSEL Jean	Clinique Traumatologique des Membres
DARGENT	Cancérologie
GUICHARD	Anatomie Pathologique
GIRARD Paul	Pathologie Générale et Expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie Chirurgicale
GIRARD Marcel	Thérapeutique
VACHON	Pathologie Médicale
GALY	Physio-Pathologie des Voies respiratoires
KEHL	Histologie
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique des Maladies Infectieuses
GONIN	Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale
MONNET	Bactériologie



Professeurs à titre personnel

MM. BERGER DORCHE	Physique nucléaire appliquée à la Médecine Technologie Pharmaceutique
----------------------	--

Professeurs sans chaire

MM. BANSILLON ROMAN BERTOYE CIER J.-François	Obstétrique Parasitologie Bactériologie Physiologie	CHATONNET CIER André PERROT	Physiologie Pharmacie et Pharmacologie Chimie organique et Toxicologie
---	--	-----------------------------------	---

Maîtres de Conférences-Agrégés

MM. FEROLDI Jacques CREYSSEL Roger DUROUX Emile BRETTE René DUMONT Louis THIVOLET Jean GARIN Jean-Paul MORET Robert ODDOUX Lucien	Anatomie pathologique Chimie Biologique et Médicale Anatomie Thérapeutique Histologie Hygiène Parasitologie Physique Botanique et Cryptogamie
---	---

Agrégés en Exercice

MM. LECUIRE MATHIEU Jacques MARION Joseph	Chargé d'enseignement	Neuro-Chirurgie Obstétrique Orthopédie
PONT Maurice VIGNON Georges REVOL Louis JAUBERT de BEAULIEU GUILLEMIN Georges BURTHIAULT René FRANÇOIS René GUINET Paul SAUTOT Jean MARION Pierre MICHAUD Pierre GIGNOUX Marcel FREIDEL Charles PLAUCHU Marcel TRAEGER Jules	Chargé d'enseignement » » » » » » » » » » » »	Propédeutique Médicale Pathologie Médicale Pathologie Médicale Pathologie Chirurgicale Propédeutique Chirurgicale Obstétrique Pédiatrie, Puériculture Médecine Générale Pathologie Chirurgicale Chirurgie Générale Chirurgie Générale Oto-Rhino-Laryngologie Stomatologie Médecine Générale Médecine Générale
DEVIC Michel COLIN Marcel GUYOTAT Jean DUMONT Martial DURAND Louis de MOURGUES Georges DESPIERRES Charles FRANCILLON Jacques TOLOT François SAUBIER Eugène COLOMB Daniel SCHOTT Bernard BONAMOUR Georges	Chargé d'enseignement » » » » » » » » » » » »	Pathologie Médicale Médecine Légale Neurologie Obstétrique Urologie Chirurgie Générale Médecine Générale Chirurgie Générale Médecine du Travail Chirurgie Générale Dermatologie Neurologie, Psychiatrie Ophtalmologie

Examineurs de la thèse

MM. MONNET, Président ; BERTOYE, FRANÇOIS, THIVOLET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Année 1961 - N° 195

CULTURE DU VIRUS GRIPPAL SUR CELLULES EPITHELIALES DE REIN DE VEAU EN COUCHES MONOCELLULAIRES

I - ADAPTATION DE LA SOUCHE APR 8

Travail du Laboratoire de Virologie
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes
(Médecin Lieutenant-Colonel MAITRE, chef de laboratoire)

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ MIXTE

DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 25 OCTOBRE 1961

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

PAR

Bernard QUAGLINO

*Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire
né le 29 février 1936 à GRENOBLE (Isère)*

A MA FEMME

En témoignage de mon amour.

A MON PERE, A MA MERE

Avec toute mon affection.

A MA SŒUR, A MES FRERES

A MES GRANDS-PARENTS

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ P. MONNET

Médecin des Hôpitaux
Professeur de Bactériologie

Il nous a accueilli avec bienveillance, nous a fait l'honneur de s'intéresser à notre travail et d'accepter la présidence de cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre respectueuse admiration.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ A. BERTOYE

Médecin des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. THIVOLET

Agrégé d'Hygiène

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ R. FRANÇOIS

Médecin des Hôpitaux

Durant nos années d'études, nous avons bénéficié
de leur enseignement.

Nous les remercions de l'intérêt qu'ils ont porté
à notre travail en acceptant de le juger.

A MONSIEUR LE MEDECIN
LIEUTENANT-COLONEL P. MAITRE

*Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Chef du Laboratoire de Bactériologie
et Médecin-Chef du Service des Contagieux
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

Pendant toute une année passée dans son Service,
nous avons bénéficié de son enseignement.

Il a bien voulu nous confier ce travail et nous
guider dans sa réalisation.

Les méthodes qu'il nous a inculquées resteront
pour nous une règle de conduite, son exemple sera
pour nous un guide précieux.

Pour ce que nous lui devons, qu'il nous soit per-
mis de lui exprimer notre respect et notre profonde
gratitude.

A MONSIEUR LE MEDECIN GENERAL BORON

*Professeur agrégé du Val de Grâce
Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A MONSIEUR LE MEDECIN COLONEL CAMELIN

*Professeur agrégé du Val de Grâce
Médecin-Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes
Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire*

A MONSIEUR LE MEDECIN-COLONEL PROTAR

*Spécialiste des Hôpitaux Militaires
Ancien Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et ancien Médecin-Chef
de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

Nous lui exprimons notre respectueuse gratitude,
car son intérêt pour ce travail et les moyens qu'il
a mis avec bienveillance à notre disposition nous
ont permis de le mener à bien.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE DE LYON,
DES HOPITAUX CIVILS ET DE L'HOPITAL MILITAIRE
D'INSTRUCTION DESGENETTES

A MES CAMARADES
DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE
MORTS DANS L'EXERCICE DE LEUR FONCTION

A MES CAMARADES DE PROMOTION

et tout particulièrement

LE MÉDECIN-LIEUTENANT J. COLETTE

Nous avons formé une équipe. Son amitié et son ardeur au travail nous furent souvent un précieux secours.

LE MÉDECIN-LIEUTENANT G. GARRIGUE

En souvenir de notre camaraderie née au laboratoire.

A MONSIEUR PROTAR

*Inspecteur Sanitaire des Abattoirs Municipaux
de la Ville de Lyon*

Nous le remercions vivement de nous avoir donné toutes facilités pour nous procurer les organes nécessaires à la préparation de nos cultures cellulaires.

AU PERSONNEL DU LABORATOIRE DE VIROLOGIE
DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DESGENETTES

Nous y avons trouvé le meilleur accueil.

Nous remercions MADAME ETTZEVE de sa collaboration. Elle a contribué à notre initiation aux techniques virologiques, son aide nous fut précieuse pendant toute une année.

Nous remercions aussi MADemoiselle DERONE, qui a effectué une partie des réactions sérologiques mentionnées dans ce travail.

NOS REMERCIEMENTS VONT AUSSI AU PERSONNEL
DU SERVICE DES CONTAGIEUX
DE L'HOPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION DESGENETTES

INTRODUCTION

Au cours des premiers mois de notre stage dans le Service des Contagieux de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes nous avons été étonnés par la fréquence des pneumopathies d'origine grippale chez les jeunes adultes effectuant leur service militaire. Comme notre orientation personnelle nous faisait prendre intérêt aux techniques de laboratoire, le Médecin Lieutenant-Colonel MAITRE nous conseilla d'étudier le comportement du virus grippal au laboratoire, dans le but que nous en retirions quelques bénéfices sur le plan des applications pratiques.

La littérature se rapportant à ce sujet nous a offert des perspectives diverses : nous savions que les études du comportement du virus grippal sur œuf embryonné avaient donné de nombreuses satisfactions ; mais nous avons été surpris de constater qu'il n'en était pas de même avec la technique de culture cellulaire, alors que celle-ci s'est révélée excellente pour l'étude de nombreux autres virus. De la lecture des travaux concernant le virus grippal se dégage l'impression que les résultats sont décevants, et nous nous sommes attachés à l'étude des causes susceptibles d'expliquer ces résultats peu encourageants.

Dans ce but, nous avons tenté d'adapter la souche de laboratoire APR 8 sur un système de culture cellulaire, en essayant d'obtenir un rendement correct.

Plusieurs essais nous ont amené à choisir comme support les cellules rénales de veau dispersées par la trypsine. Nous avons utilisé les techniques classiques pour réaliser les subcultures virales et étudier quelques facteurs, dépendant soit de la cellule-hôte, soit du virus, susceptibles d'influencer le rendement du système utilisé.

Les résultats obtenus, confrontés avec ceux décrits dans la littérature, nous ont amené à approfondir les problèmes d'interférence virale.

Tenant compte de ce facteur primordial, nous avons réussi à accroître de façon nette la production de virus, nous plaçant quant au nombre de particules virales contenues dans l'inoculat, dans des conditions proches de celles d'un isolement direct sur culture cellulaire.

La souche virale obtenue à l'issue des subcultures a été typée. Nos conclusions, qui résument les résultats obtenus, proposent en outre quelques applications pratiques, la plus importante étant son utilisation éventuelle dans la préparation d'un vaccin spécifique.

Lorsque nous avons entrepris ce travail, nos appréhensions étaient grandes, car nous ignorions à peu près tout des techniques à mettre en œuvre. L'apprentissage fut long et difficile, aussi bien pour la réalisation des cultures cellulaires que pour les méthodes d'étude du comportement du virus grippal. L'intérêt et les conseils du Médecin Lieutenant-Colonel MAITRE pour ce travail, le fait que celui-ci fut réalisé en équipe, nous ont aidé à surmonter bien des difficultés et nous ont permis de le mener à bien.

PREMIERE PARTIE

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Les techniques de culture de virus sur cellules animales ou humaines proliférant *in vitro* ont pris au cours des dix dernières années une importance considérable, cette période étant dominée par les études concernant le virus poliomyélitique.

On constate que l'étude du virus grippal par ces méthodes a pris de l'extension depuis 1954, mais à un degré moindre que les progrès concernant l'étude d'autres virus (oreillons, APC, etc.) ne le laissaient espérer.

Pourtant, depuis les travaux de YOUNGNER (69), une méthode d'extraction cellulaire à partir de fragments tissulaires agités dans une solution trypsique permet d'obtenir des cultures cellulaires d'excellente qualité. Des modifications techniques (54 - 3 - 13) mettent maintenant à la disposition des expérimentateurs diverses méthodes issues de celle de YOUNGNER qui, toutes, ont un bon rendement.

Avant l'apparition des techniques récentes de cultures cellulaires, le matériel de choix pour l'étude du virus grippal était l'œuf embryonné. Matériel coûteux, délicat, mais d'un rendement tel que nul autre ne l'a encore supplanté, tant pour les isolements de souches virales nouvelles que pour les études du comportement de ces souches nouvelles ou des souches adaptées, dites de laboratoire.

Faisant transition entre les méthodes de cultures virales sur œuf embryonné et celles sur cultures monocellulaires, la technique de culture sur membranes chorioallantoïques en suspension dans un milieu nutritif a donné des résultats intéressants :

GADJUSEK (21) compare la croissance du virus grippal sur œuf embryonné et sur membranes chorioallantoïques en suspension. Pour ce dernier système les doses inoculées sont de dix ID_{50} ⁽¹⁾ par millilitre de milieu de survie. La mesure du pouvoir infectieux montre que celui du virus obtenu sur l'œuf embryonné est cinq à dix fois plus important que celui du virus obtenu sur les membranes.

Les membranes chorioallantoïques sont utilisées par ACKERMANN et MASSAAB (1) pour étudier la croissance de la souche APR 8. Des fragments de membranes chorioallantoïques sont maintenues en suspension dans la solution de SIMM. La souche virale a été passée sur furet (7 fois), sur souris (593 fois), et sur œuf embryonné (148 fois). L'inoculat est du liquide allantoïque dont le titre infectieux est de $10^{9.3}$ EID_{50} . Les dilutions (— log 8,3 à — log 5,3 EID_{50}) sont réalisées dans la solution de SIMM. Vingt-quatre heures après l'inoculation, les titres infectieux des liquides surnageants s'avèrent inférieurs à ceux des inoculats. Cependant la production virale montre une progression dans le temps, le maximum étant atteint à la quatorzième heure.

Des travaux récents (63) montrent que ce support est d'un rendement appréciable : les membranes chorioallantoïques en suspension dans la solution de HANKS sans glucose ni bicarbonate de sodium sont agitées, centrifugées (1.000 tours par minute pendant cinq minutes) et le culot de centrifugation est remis en suspension, après lavage, dans un volume égal de solution BSS. La suspension cellulaire ainsi obtenue est répartie à raison de 0,7 millilitre pour 1 millilitre de milieu de survie (milieu avec pyruvate de sodium, glycine, molybdate de sodium, acide folique, glycérine remplaçant le glucose) dans des tubes ou flacons dont certains contiennent de la laine de verre. La souche virale est une souche A, à son troisième passage sur œuf embryonné. Le volume de l'inoculat (2 à 8 UHa ⁽²⁾ pour 0,25 millilitre) est de 0,1 millilitre. Le titre hémagglutinant maximum (1/64) est obtenu à la soixante-douzième heure.

⁽¹⁾ ID_{50} = Dose infectieuse 50.

⁽²⁾ UHa = Unité Hémagglutinante.

L'utilisation d'inoculats importants de la souche APR 8 (118 UHa et 274 UHa) dans des flacons de 1.000 millilitres contenant 150 millilitres de milieu de survie permet d'obtenir des titres hémagglutinants importants : ainsi avec 118 UHa ces titres sont le premier jour : 1/96, les deuxième et troisième jour : 1/128, le quatrième jour : 1/96. Enfin les auteurs, s'ils font état de résultats positifs avec des souches virales passées sur œuf ou adaptées à la souris, aboutissent à un échec en utilisant comme inoculat de départ le produit de lavages de gorges de malades.

Signalons enfin que c'est en utilisant les membranes chorioallantoïques en suspension que ISAACS, LINDENMANN, et VALENTINE (35) étudiant le phénomène d'interférence virale produit par le virus grippal inactivé, découvrent l'interféron.

Les progrès réalisés dans les techniques de cultures cellulaires en couche monocellulaire ont permis d'étudier le comportement de souches grippales sur des cellules d'origines diverses.

Il semble logique de s'adresser en premier lieu à des organes que l'on sait réceptifs *in vivo* à l'infection grippale. C'est pourquoi de nombreux auteurs ont utilisé les cultures cellulaires obtenues à partir de tissu pulmonaire.

Dès 1947 ENDERS et PEARSON (18) utilisent les cultures de cellules pulmonaires d'embryons de poulets pour étudier la souche A MELBOURNE. Cette souche virale, après 300 passages sur œuf embryonné, est démontrée pathogène pour la souris (inoculation intranasale de 0,05 millilitre d'une dilution à 10^{-5} de liquide allantoïque).

L'inoculat viral est mélangé aux fragments de tissu, et le tissu infecté est introduit dans des tubes-roulants (0,6 millilitres par tube). Le milieu de survie consiste en solution de SIMM (70 pour cent) additionnée d'extraits embryonnaires de poulet (20 pour cent) et de sérum de poulet (10 pour cent). Le pouvoir pathogène pour la souris des surnageants et des tissus inoculés est testé à intervalles réguliers pendant un mois. Avec le surnageant dilué au 1/10, plus de 50 pour cent des souris meurent. Avec des dilutions au 1/100 ou au 1/1.000, plus de 50 pour cent des animaux survivent, mais présentent des

lésions pulmonaires. Les tissus infectés, broyés et dilués au 1/10 et au 1/100, laissent survivre plus de 50 pour cent des animaux inoculés.

D'autres auteurs (58) étudient le rendement de divers tissus embryonnaires de poulet par la technique des tubes roulants et celle des cultures cellulaires sur membranes de cellophane. L'inoculat est préparé par inoculation de la souche virale APR 8 (dilution 10^{-4}) à des œufs embryonnés de dix jours (voie intra-allantoïque — 0,2 millilitre par œuf). La récolte est effectuée après quarante-huit heures. Les cultures cellulaires en tubes roulants sont infectées avec $10^{3.83}$ ID₅₀ et les résultats diffèrent selon le type de tissu. C'est ainsi qu'avec le tissu cardiaque il n'y a plus de virus dans le surnageant trois jours après l'inoculation. Par contre le titre est de 10^3 ID₅₀ dans le surnageant du tissu cornéen quarante-huit heures après l'inoculation — les subcultures virales sur ce tissu sont d'un rendement nul. Quant au tissu pulmonaire, si aux quatrième et septième jours le titre est de 10^4 ID₅₀, lors des subcultures virales il n'y a pratiquement pas production de virus.

En ce qui concerne les cultures cellulaires sur membranes de cellophane, l'inoculat est de $10^{4.83}$ ID₅₀. Les auteurs utilisent les tissus cardiaques et pulmonaires. Les titres infectieux décroissent régulièrement en six ou sept jours, de façon comparable à ceux des tubes témoins ne contenant que le milieu de survie ; ce qui montre que le virus grippal ne s'est pas multiplié sur les cellules cardiaques ou pulmonaires maintenues en survie par cette technique particulière.

L'étude de l'influence de la température sur la production du virus grippal amène COLVILLE (11) à réaliser des cultures cellulaires de plusieurs organes (poumon, cœur, peau, muscle, etc.) d'embryons de poulets et de poussins de deux jours. Le milieu de survie de ces cultures cellulaires est la solution de HANKS enrichie par du sérum de poulet (10 ou 20 pour cent) et par des extraits embryonnaires (50 ou 2 pour cent). L'inoculat est constitué par une dilution à 10^{-3} de liquide allantoïque infecté par la souche APR 8. Deux jours après l'inoculation des cultures cellulaires, le titre hémagglutinant du surnageant est de 1/64 pour les cellules pulmonaires embryonnaires, les températures d'incubation étant de 37° C ou 41° C. Par contre dans les mêmes conditions les cellules pulmonaires de poussins, cons-

tituées surtout de fibroblastes, n'ont pratiquement pas produit d'hémagglutinines. Les autres tissus testés (cœur, muscle, peau, foie) sont d'un rendement nul ou très faible.

En 1956 MOGABGAB, SIMPSON et GREEN (46) étudient les caractères de la croissance de souches virales isolées l'année précédente sur cellules rénales ou pulmonaires d'embryons humains. Nous envisagerons plus loin les résultats obtenus avec les cellules rénales. Les cellules pulmonaires embryonnaires sont obtenues par la méthode de l'explant sur caillot de plasma, le milieu nutritif consistant en milieu 199 ou liquide amniotique de bœuf (90 pour cent), extrait embryonnaire de bœuf (5 pour cent), sérum de cheval (5 pour cent), auxquels sont ajoutés le « soybean trypsin inhibitor » (0,1 milligramme par millilitre) et des antibiotiques. Les souches virales A et B étudiées sont inoculées après dilution au 1/100 dans une solution saline tamponnée contenant 10 pour cent de sérum de cheval.

Avec la souche A il n'y a pas production d'agglutinines au cours de cinq passages successifs.

Avec la souche B, si le virus infectieux est décelable dès la seizième heure, les agglutinines n'apparaissent que trente-six heures après l'inoculation. L'inoculat des passages successifs est le surnageant des cultures cellulaires, prélevé trois jours après l'inoculation. Les titres hémagglutinants sont pour trois passages successifs, respectivement inf. à 1/4 ; log 2,4 ; log 2,3 le troisième jour. Sept jours après l'inoculation, ils sont : log 1,3 ; log 2,1 ; log 2,4.

Le comportement de cette souche B est comparée à celui des souches de laboratoires APR 8 et BLee. Il s'avère que sur cultures de cellules pulmonaires ces deux souches sont dépourvues de pouvoir cytopathogène et ne produisent pratiquement pas d'agglutinines.

D'autres études concernant les cellules pulmonaires, animales ou humaines, confirment le fait que ce système cellulaire, constitué surtout de cellules fibroblastiques, est d'un rendement médiocre.

Ainsi MOLDAWSKI et GHENDON (48) cherchent à mettre au point une méthode rapide de détection du virus grippal sur cultures cellulaires en milieu gélatiné. Les cellules sont des fibroblastes obtenus à partir de poumon d'embryon humain et sont maintenues en survie

dans le milieu de BARSKI n° 27 (liquide amniotique de bœuf : 45 pour cent — solution de HANKS : 25 pour cent — sérum humain : 20 pour cent — extrait embryonnaire de bœuf : 10 pour cent). Ces auteurs n'obtiennent ni lésion cytopathogène ni production d'agglutinines avec des inoculats de la souche APR 8 produisant sur l'œuf embryonné des titres infectieux de 10^5 à 10^7 .

GOSTLING (24) utilise des cellules pulmonaires d'embryons de souris. La souche est la souche A'RHOES qui a été passée 4 fois sur furet et plus de 100 fois sur souris. Les inoculats sont préparés selon la technique suivante : Des souris sont infectées par voie intranasale. Leurs poumons sont homogénéisés et mis en suspension dans du milieu de PARKER contenant 5 pour cent de sérum de lapin. Cette suspension virale est diluée au 1/100. Après inoculation des cultures cellulaires, celles-ci sont incubées à 37° C pendant un jour, puis la moitié du milieu de survie est alors renouvelée. Dans le milieu de survie prélevé, l'auteur constate une augmentation de 3 log 10 unités de la concentration en virus infectieux.

Certains auteurs (31) n'utilisent pas la trypsine pour disperser les cellules, mais font appel à la collagénase. Ils obtiennent ainsi des cultures de cellules pulmonaires de diverses espèces : homme, lapin, porc ; et comparent le comportement sur ces systèmes cellulaires de quatre souches de virus grippal. L'inoculat est du liquide allantoïque qui, après lyophilisation, est dilué au 1/10 dans la solution de HANKS additionnée de 5 pour cent de sérum de cheval. Les cultures cellulaires sont lavées avec la solution de HANKS avant l'introduction de 0,1 millilitre de suspension virale. Le milieu de survie (0,9 millilitre par tube) contient 5 pour cent de sérum homologue. Les auteurs réalisent des subcultures virales, l'inoculat de chaque passage consistant dans le produit obtenu après trois congélations-décongélations successives des cellules et du surnageant d'un tube inoculé. Cet inoculat est préparé lorsque l'effet cytopathogène affecte 70 à 80 pour cent des cellules, ou bien 6 à 7 jours après l'inoculation si l'effet cytopathogène est resté minime. Les résultats obtenus sont variables selon le complexe souche virale-cellule hôte considéré. Sur cellules pulmonaires les titres hémagglutinants sont maxima avec la souche BLee (1/80 au premier passage, 1/160 au quinzième), les souches AAsia et APR 8 ont une production d'agglutinines comparables (1/80 au quinzième passage) ; quant au virus de la grippe du porc, il ne produit aucune particule agglutinante.

Les rendements sont nuls avec les cellules pulmonaires de lapin. Avec les cellules pulmonaires de porc, ces rendements sont pratiquement nuls avec les trois souches A Asia, APR 8, B Lee, mais par contre les titres hémagglutinants obtenus avec le virus de la grippe du porc sont élevés : 1/160 au premier passage, 1/640 au vingtième passage. Le comportement de ces quatre souches virales est étudié sur des cultures de cellules de rein de porc (médullaire et corticale). Seul le virus de la grippe du porc se multiplie sur ce système cellulaire, avec un rendement faible.

Une autre catégorie de cellules, comme par exemple les cellules KB ou Hela, issues de néoplasmes humains, a été utilisée pour l'étude de nombreux virus, mais, comme nous pourrions le constater, s'est avérée d'un faible profit pour la production de virus grippal.

TYRREL en 1955 (61) a comparé le comportement de cinq souches virales cultivées sur cellule Hela et sur cellules pulmonaires et hépatiques d'embryons de poulets, ces dernières étant obtenues par trypsination des organes. Les milieux de survie utilisés sont pour les cellules Hela : solution MS, 70 pour cent ; liquide amniotique de bœuf, 15 pour cent ; sérum humain, de bœuf, de cheval, 15 pour cent. Pour les cellules pulmonaires ou hépatiques, le milieu de survie est constitué du mélange : liquide amniotique de bœuf, 90 pour cent ; extrait embryonnaire, 5 pour cent ; sérum de cheval inactivé, 5 pour cent. Les souches virales sont inoculées à l'œuf embryonné et le liquide allantoïque recueilli a des titres hémagglutinants variant entre 1.000 UHa et 8.000 UHa. Ce liquide allantoïque dilué au 1/10 est inoculé sous un volume de 1 millilitre aux tubes contenant les cultures cellulaires. Il n'y a ni production d'agglutinines ni lésion cytopathogène sur la culture de cellules Hela. Avec les cellules hépatiques les souches virales APR 8 et B Lee sont d'un rendement nul, alors que les souches NWS et WS se multiplient et provoquent l'apparition de lésions cytopathogènes. Avec les cellules pulmonaires les résultats diffèrent selon la souche virale. Les titres hémagglutinants maxima sont respectivement atteints le deuxième jour : (1/256) avec la souche WS et (1/32) avec la souche NWS. Ce titre est de (1/128) au premier jour avec la souche B Lee. Quant à la souche APR 8, elle ne produit pas d'hémagglutinines sur ce système cellulaire.

D'autres auteurs (30) ont obtenu avec des cultures de cellules Hela un effet cytopathogène et la production d'hémagglutinines non

infectieuses. L'inoculat est préparé par inoculation (souche APR 8) intraallantoïque d'œufs embryonnés de 11 à 12 jours. Le liquide allantoïque recueilli 48 heures plus tard est conservé à -65° C. Le liquide allantoïque est dilué dans du milieu de survie contenant du sérum de cheval, et les tubes de cultures cellulaires sont inoculés avec 0,2 millilitres de dilutions. Pour obtenir un effet cytopathogène l'inoculat doit être de 10^5 EID₅₀, et les cellules sont détruites en totalité avec un inoculat de 10^7 EID₅₀. Ces doses diluées au 1/10 ou au 1/100 ne permettent d'atteindre qu'une partie des cellules contenues dans chaque tube. Des subcultures virales montrent une diminution rapide du pouvoir cytopathogène de la souche virale, et d'autre part ce pouvoir cytopathogène est totalement inhibé par exposition prolongée de l'inoculat au rayonnement ultra-violet. La production d'agglutinines reste faible, mais elle est proportionnelle à la dose de virus inoculée : avec des dilutions de $10^{-0,3}$ et 10^{-2} , les titres hémagglutinants obtenus 24 heures après l'inoculation sont respectivement de log 2,4 et log 1,2. Ces agglutinines ne sont détectées dans les surnageants qu'après l'apparition des lésions cytopathogènes. La destruction par des procédés physiques des cellules demeurées indemnes permet de libérer des agglutinines, ce qui montre que les particules virales ne peuvent être libérées que par destruction cellulaire. En outre, les auteurs calculent que la quantité totale d'agglutinines obtenues dans un flacon contenant environ $10^{7,3}$ cellules au moment de l'inoculation est de $10^{4,2}$ à $10^{4,8}$ UHa, soit une production de 0,0008 à 0,003 UHa par cellule.

Une étude des propriétés cytotoxiques de la souche B Lee à l'égard des cellules Hela amène WAGNER (66) à noter des différences sensibles selon les doses inoculées : la culture cellulaire est maintenue en survie avec du milieu de SHERER contenant 20 pour cent de sérum de cheval. L'inoculat est sous forme de liquide allantoïque. Non dilué, il provoque en 48 heures l'apparition de lésions cytopathogènes caractéristiques ; une dilution au 1/100 ne produit que des lésions discrètes ; et, avec une dilution au 1/1.000, aucun effet cytopathogène n'est noté par l'auteur.

Des résultats du même ordre sont obtenus par PAYNE et ACKERMANN (51) qui inoculent les souches AWS, WSN, WSA sur cultures de cellules Hela. L'effet cytopathogène se manifeste à partir du troisième ou quatrième jour, sous forme de plaques, atteignant leur

nombre maximum 8 jours après l'inoculation, ce nombre étant directement proportionnel au volume de l'inoculat. Par contre les souches APR 8 et FM 1 ne produisent aucune lésion.

Ni les cellules pulmonaires ni les souches cellulaires de laboratoire ne permettent donc l'obtention de rendements appréciables dans la production de virus grippal. D'autres systèmes cellulaires se sont par contre avérés d'un meilleur profit.

Les premiers isollements du virus grippal sur cultures cellulaires ont été réalisés avec des cellules rénales d'embryons humains par MOGABGAB et coll. (44) en 1954. L'année suivante, d'autres auteurs (45-59) isolent de nouvelles souches virales sur cellules rénales de singe. Les cellules rénales d'embryon humain furent aussi utilisées avec succès dans ce but (6). Il apparaît donc que les cellules rénales constituent un système cellulaire sensible au virus grippal, encore que KILBOURNE (38) fasse état d'un échec dans ses tentatives d'isolement sur cellules rénales de singe, lors de l'épidémie de grippe « asiatique » de l'année 1957.

Mais si l'isolement d'une souche virale est un problème important, l'étude des relations entre le virus et la cellule hôte ne l'est pas moins, et nous n'avons pas rencontré encore de système cellulaire satisfaisant cet aspect de la recherche virale.

Nous avons vu que MOGABGAB et coll. (46) avaient étudié le comportement du virus grippal cultivé sur les cellules pulmonaires. Ces auteurs réalisent en même temps une étude de ce comportement sur culture de cellules rénales embryonnaires humaines dispersées par la trypsine dont la pousse s'effectue en tubes roulants. Les souches virales étudiées ont été isolées directement sur cultures cellulaires. Des subcultures virales sont réalisées : les trois premiers passages sur explants, les cinq suivants sur cellules dispersées par la trypsine. L'inoculat de chaque passage est le liquide surnageant du passage précédent, non dilué, prélevé trois jours après l'inoculation de la culture cellulaire.

Avec la souche virale A, il y a au fil des passages une faible augmentation des titres hémagglutinants (log 1,8 au premier passage, log 2,7 au huitième). Dans chaque subculture virale, la présence

de virus infectieux pour l'œuf embryonné est décelée huit heures après l'inoculation de la culture cellulaire, les agglutinines n'apparaissant qu'à la douzième heure.

Avec la souche B la production virale n'augmente qu'à partir de la seizième heure, et le titre hémagglutinant maximum ($\log 5,8$) est atteint lors de la cinquième subculture virale, trois jours après l'inoculation.

Des changements journaliers du milieu de survie amènent les auteurs à constater qu'après atteinte du titre hémagglutinant maximum, il y a cependant production continue de particules virales, indiquant une libération continue du virus ou son relâchement dans le milieu de survie à la suite de la destruction cellulaire. Les auteurs déterminent en outre le délai nécessaire à l'obtention des titres hémagglutinants maxima, en inoculant des groupes de cultures cellulaires avec 0,1 millilitre de suspension virale à des dilutions variables (10^{-1} à 10^{-5}). Ce délai est de 48 heures.

Enfin les épreuves d'inhibition de l'hémagglutination montrent que les caractères antigéniques des souches virales n'ont pas varié par suite des passages sur cellules rénales embryonnaires humaines.

L'année suivante, les mêmes auteurs publient les résultats d'une expérimentation comparable (47). Plusieurs souches cellulaires sont utilisées, maintenues en survie avec le milieu suivant : milieu 199, 90 pour cent ; sérum de cheval inactivé 5 pour cent ; extrait embryonnaire de bœuf, 5 pour cent ; antibiotiques, à la concentration habituelle. Quatre souches virales sont inoculées à des cellules Hela : souche APR 8, souche A adaptée aux cellules rénales embryonnaires humaines, souche A adaptée aux cellules pulmonaires embryonnaires humaines, souche B Lee. Seules les souches APR 8 et B Lee produisent des agglutinines sur le système cellulaire. Les auteurs notent que, pour obtenir un effet cytopathogène, les concentrations virales doivent être de 10^6 EID₅₀ et que la production d'agglutinines, par ailleurs non infectieuses, n'est obtenue qu'avec des concentrations de 10^7 EID₅₀.

Parallèlement la comparaison de la croissance sur cellules rénales de singe est effectuée, concernant une souche virale B isolée sur cellules rénales de singe et la souche B Lee, adaptée à l'œuf embryonné. Des dilutions virales (de 10^{-1} à 10^{-6}) sont inoculées à raison de 0,1 millilitre par tube. La souche B est passée 12 fois sur ce système

cellulaire : les titres hémagglutinants maximaux sont obtenus pour chaque passage trois à quatre jours après l'inoculation, mais demeurent faibles ($1/2$ au premier passage, $1/4$ au douzième). A partir du cinquième jour, ces taux chutent très rapidement. Les titres hémagglutinants obtenus avec la souche B Lee ne sont pas plus élevés, et sont atteints plus tardivement ($1/2$ le douzième jour). Les auteurs notent que plus la dilution virale est élevée, plus les agglutinines apparaissent tardivement. Notons que, pour ces expérimentations, le milieu de survie des cultures cellulaires était renouvelé quotidiennement pendant les neuf jours qui suivaient l'inoculation.

Les cellules rénales de porc ont aussi été utilisées, en particulier par HOLPER et MARQUIS (33) qui cultivent sur ce système cellulaire une souche A' adaptée aux cellules rénales de singe. Les auteurs s'attachent à l'étude du pouvoir inhibiteur de l'hydrolysate de lactalbumine, en pourcentage variable dans le milieu de survie. Les cellules rénales de porc sont obtenues par la méthode de YOUNGNER et chaque tube de culture est inoculé avec 10^3 TCID₅₀ (1). Les taux hémagglutinants croissent avec la durée de l'incubation, mais sont très différents selon le pourcentage d'hydrolysate de lactalbumine contenu dans le milieu. Avec 0,25 pour cent ces titres sont de $1/128$ à la quarante-huitième heure, de $1/256$ à la soixante-douzième heure. Avec 1 pour cent ils sont respectivement de $1/4$ et de $1/64$. Dans une autre expérimentation, les auteurs changent chaque jour le milieu de survie, sans obtenir des résultats meilleurs. Enfin le fait de renouveler le milieu de survie quatre heures après l'inoculation ne provoque pas de changements dans les titres hémagglutinants obtenus à la quarante-huitième heure.

Ces expérimentations montrent cependant que les cellules rénales sont un support correct pour l'étude de la croissance du virus grippal. Ce fait est confirmé par d'autres travaux, en particulier ceux de HAAS et WULFF (25). Ces auteurs réalisent des subcultures virales de la souche APR 8 sur cultures de cellules rénales de veau dispersées par la trypsine et maintenues en survie avec le milieu 199. Il faut cinq à sept jours pour obtenir une couche monocellulaire continue qui puisse être alors inoculée. La souche APR 8 utilisée comme inoculat a été passée 37 fois sur œuf embryonné et 21 fois sur culture de cellules rénales de porc (le titre hémagglutinant à l'issue du vingt et unième passage étant de $1/80$). Les dilutions

(1) TCID₅₀ = Dose infectieuse 50 pour culture de tissu.

virales sont faites avec le milieu 199 sans sérum. Avant d'être inoculée, la culture cellulaire est lavée à trois reprises avec la solution saline de HANKS. Les volumes des inoculats (dilution au 1/100) sont de 4 millilitres pour les flacons ERLLENMEYER et de 1 millilitre pour les tubes. Après trois heures d'incubation à 37° C, l'inoculat est rejeté, la culture cellulaire lavée, puis le milieu de survie est ajouté (4 millilitres par flacon, 1 millilitre par tube). Les flacons et les tubes sont alors placés à l'étuve à 37° C. Les dosages des agglutinines sont effectués cinq jours après l'inoculation : le taux maximum (1/1.280) est obtenu lors du quatrième passage, le taux minimum étant celui du premier passage (1/160). A l'issue du dixième passage, une épreuve de neutralisation montre que la spécificité antigénique de la souche est conservée.

HEATH et TYRREL en 1958 (27) réalisent une expérimentation comparable, montrant l'adaptation de plusieurs souches virales à divers systèmes cellulaires. Le premier groupe d'expériences consiste à comparer l'évolution de trois souches virales (Sendaï, WS, Grippe du porc) cultivées sur cellules pulmonaires du porc et cellules rénales d'embryon de bœuf. Ces cellules, dispersées par la trypsine, sont maintenues en survie avec un milieu à l'hydrolysate de lactalbumine (0.25 pour cent) dans la solution saline de HANKS additionnée de 10 pour cent de sérum de cheval. Les virus sont préparés par inoculation intraallantoïque d'œufs embryonnés de 10 jours, le liquide allantoïque recueilli étant stocké à — 70° C. Les inoculats sont de 0,5 millilitre par tube, à raison de 0,5 à 1 UHa dans 0,5 millilitre de diluant. Les titrages quotidiens des agglutinines montrent un rendement meilleur des cultures de cellules rénales : avec les souches Sendaï, WS et Grippe du porc, les taux atteints sont respectivement : 1/32 le premier jour, 1/32 le deuxième jour, 1/64 le cinquième jour ; alors qu'avec les cultures de cellules pulmonaires ces taux sont : 1/2 le deuxième jour, 1/8 le quatrième jour. La souche WS cultivée sur cellules rénales a une production diphasique d'agglutinines virales, la deuxième onde se produisant le sixième jour (titre Ha : 1/8).

NEGRONI et TYRREL (50), qui inoculent des cultures cellulaires de rein de veau en tubes roulants avec 1 UHa de la souche WS, obtiennent des taux hémagglutinants importants (1/256 le premier jour, 1/364 le deuxième jour, 1/32 le troisième jour).

Certains auteurs, s'attachant aux problèmes des anticorps fluorescents (15), inoculent 0,3 millilitre d'une suspension virale contenant $10^{5.0}$ EID₅₀ par millilitre d'une souche A, à des cultures de cellules rénales de veau, cellules fibroblastiques d'embryons de poulet et cellules amniotiques humaines. Ils démontrent la présence de virus dans le surnageant des cultures cellulaires, seulement avec les cellules rénales.

Les expérimentations que nous avons rappelées ont permis de constater que l'étude du virus grippal à l'aide de cultures cellulaires n'apportait pas les résultats que l'on était en droit d'espérer. La croissance virale s'avère d'une façon générale médiocre ; les explications données à ce fait restent pour beaucoup d'entre elles encore à l'état d'hypothèse.

Sur la multitude des systèmes cellulaires étudiés, les inoculats sont en général forts pour l'obtention d'une quantité de virus peu importante. Il se dégage donc l'impression que l'œuf embryonné de poule demeure encore, malgré ses inconvénients, le meilleur moyen pour la production de virus en grande quantité, dans un but d'étude ou encore dans un but prophylactique (fabrication de vaccin).

Les expérimentations réalisées sur cellules de rein de veau ont retenu notre attention, car il s'agit d'un matériel courant, peu coûteux, qui par ailleurs paraît avoir donné des résultats intéressants. C'est pourquoi nous avons entrepris le travail que nous exposons.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

MATERIEL ET TECHNIQUES UTILISES

Nous ne décrirons dans ce chapitre que les techniques de base dont la mise en œuvre était courante. Les techniques particulières utilisées dans certaines expériences seront décrites ultérieurement.

I. CULTURES CELLULAIRES.

Des essais ont été pratiqués sur plusieurs systèmes cellulaires :

1°) Cellules fibroblastiques préparées à partir d'embryons de poulets ou de souriceaux nouveau-nés.

2°) Cellules épithéliales rénales de cobayes, souris et poussins.

Les résultats obtenus sont encore trop fragmentaires pour donner lieu à un exposé.

Ce sont surtout les cellules épithéliales de rein de veau qui furent utilisées dans le travail que nous présentons.

A) RÉALISATION DES PRIMO-CULTURES CELLULAIRES

(1) *Préparation du tissu.*

Les reins de veaux sont obtenus aux abattoirs de la ville de Lyon. Leur prélèvement est réalisé dans des conditions de stérilité précaires ; c'est pourquoi, une fois la capsule éliminée, les fragments recueillis après dissection de la corticale sont lavés à plusieurs reprises dans du liquide de HANKS contenant 200.000 Unités de Pénicilline et 50 mg de Streptomycine par litre.

Les fragments sont alors découpés de façon plus fine à l'aide d'une paire de ciseaux, puis ils sont lavés encore plusieurs fois.

Une partie de la préparation ainsi obtenue est destinée à être traitée immédiatement. Quant à l'autre partie, elle est conservée au réfrigérateur à $+ 4^{\circ}\text{C}$, après addition de milieu nutritif contenant 10 pour cent de sérum. Il est ainsi possible de réaliser une ou plusieurs trypsinations dans les jours qui suivent.

(2) *Trypsination.*

a) Solution de trypsine.

On utilise la trypsine de l'Institut Pasteur de Garches en solution à 0,25 pour cent dans de la solution de HANKS ne contenant ni calcium ni magnésium. Cette solution trypsique que l'on conserve à $+ 4^{\circ}\text{C}$, est réchauffée au bain-marie à 37°C au moment de la manipulation.

b) Techniques de trypsination.

Deux procédés ont été utilisés.

1°) Trypsination à chaud.

Il s'agit du procédé basé sur le principe décrit par YOUNGNER (69), mais que l'on a modifié en adoptant comme chambre de digestion le flacon de RAPPAPORT (54). L'agitation des fragments de tissu dans la solution trypsique est maintenue à l'aide d'un barreau et d'un agitateur magnétiques.

La trypsination proprement dite est précédée d'un stade de pré-trypsination effectuée à 37° C pendant 60 minutes. Pendant la trypsination, les décantations sont effectuées toutes les 20 minutes. La suspension cellulaire est collectée, après passage sur un voile de nylon, dans un flacon maintenu dans un bain glacé.

2°) Trypsination à froid.

Nous avons également utilisé la méthode de trypsination à froid, décrite par BODIAN puis par DANIEL et DEPOUX (13). Les résultats obtenus ont été satisfaisants.

c) Préparation de la suspension cellulaire.

Les cellules dispensées par la trypsine sont rassemblées par centrifugation à basse vitesse (800 tours/minute) dans une centrifugeuse réfrigérée.

Les cellules sont remises en suspension dans du milieu nutritif, à la concentration de 800.000 cellules par millilitre. Les numérations sont effectuées à l'hématocrite après coloration au Bleu Trypan (12).

(3) *Milieux de Culture.*

Tous les milieux de culture sont préparés au laboratoire. Nous avons utilisé comme solution saline de base le liquide de HANKS (5). Les milieux proprement dits, que nous avons employés ont été selon les cas :

— le milieu de LEPINE et coll. (40) à l'hydrolysate de caséine ;

— le milieu à l'hydrolysate de lactalbumine, additionné de 1 g pour 1.000 d'extrait de levure de l'Institut Pasteur ;

— le milieu de EAGLE (17).

Les milieux ont été stérilisés sur bougie Chamberland L 3 ou sur disques Seitz.

Les sérums destinés à compléter les milieux de culture sont obtenus aux abattoirs, filtrés sur disques Seitz et décomplémentés par un séjour au bain-marie à 56° C pendant 30 minutes. Nous avons employé du sérum de poulain et du sérum de veau.

Les milieux ont été utilisés selon deux modalités :

1°) Milieu de croissance : contenant 10 pour cent de sérum.

2°) Milieu d'entretien : contenant 3 pour cent de sérum.

Au moment de l'utilisation on ajoute un mélange d'antibiotiques constitué par 200 U. de Pénicilline et 50 microgr. de Streptomycine pour 1 ml de milieu.

(4) *Répartition de la suspension cellulaire.*

a) Flacons de 250 ml (surface utile : 5×13 cm)ensemencés avec 20 ml de suspension cellulaire.

b) Flacons de 75 ml (surface utile : 4×7 cm)ensemencés avec 7 ml.

c) Boîtes de Roux de 1 lensemencées avec 100 ml.

d) Tubes-lamellesensemencés avec 2 ml.

(5) *Incubation des cultures cellulaires.*

Elle est réalisée en étuve à 36° C.

Le milieu de croissance est changé le troisième jour.

B) RÉALISATION DES SUBCULTURES CELLAIRES

Des subcultures ont été réalisées en remettant en suspension des cellules de primocultures :

— soit à l'aide d'une solution tryptique à 0,25 pour cent dans la solution de HANKS ;

— soit en utilisant le sel disodique de l'acide éthylène diamine trétraacétique (complexon III).

II. VIRUS GRIPPAL.

Il s'agit de la souche APR 8 (Institut Pasteur de Paris — Docteur G. CATEIGNE).

Une grande quantité de virus est préparée par inoculation intra-allantoïque d'œufs embryonnés de 11 jours. La récolte est effectuée au bout de 48 heures, le liquide obtenu est centrifugé à 3.000 tours/minute pendant 15 minutes. Après titrage du pouvoir hémagglutinant et contrôle de stérilité, le liquide est réparti en ampoules scellées, conservées au réfrigérateur à -70°C .

III. INOCULATION DES CULTURES CELLULAIRES.

(1) PRÉPARATION DE L'INOCULAT.

Le virus conservé à -70°C est décongelé au bain-marie à 37°C , et les dilutions sont réalisées dans du milieu nutritif sans sérum.

(2) INOCULATION.

On procède selon la méthode suivante :

Après élimination du milieu de culture, la couche monocellulaire est lavée à trois reprises avec la solution saline de HANKS ; cette dernière nous a paru nettement préférable à la solution PBS classiquement utilisée dans ce but.

L'inoculat est alors introduit dans le flacon ou le tube.

Les temps de contact et la température d'incubation ont été variables selon les expériences. D'une façon générale, l'incubation a duré une heure à 37°C .

IV. OBSERVATION DES CULTURES INOCULEES.

Chaque jour les cultures sont examinées à l'œil nu, dans le but d'apprécier les modifications de pH du milieu et de déceler une éventuelle dégénérescence cellulaire, importante, diffuse ou localisée.

Cet examen est suivi d'une observation au microscope, à faible grossissement, visant à la recherche des modifications cytologiques. Cette observation est complétée par l'examen de lamelles colorées à l'hématéine-éosine, prélevées dans les tubes traités parallèlement aux flacons.

Les liquides recueillis donnent lieu aux investigations suivantes :

1°) Recherche du pouvoir hémagglutinant :

On utilise la technique classique. La suspension globulaire est préparée à partir d'un culot d'hématies humaines du groupe O, lavées trois fois. La solution employée pour les lavages et la préparation des suspensions et dilutions est réalisée avec de l'eau physiologique sans cuivre.

2°) Recherche du pouvoir fixant le complément :

Technique de fixation longue à froid, réalisée en microméthode (56). L'épreuve est effectuée en utilisant des sérums de malades, conservés à — 20° C.

CHAPITRE II

RESULTATS : DEROULEMENT DE L'ADAPTATION

1. — PRIMOCULTURE

A) SYSTÈME DE CULTURE CELLULAIRE.

Cellules de rein de veau préparées selon la technique précédemment décrite.

B) SOUCHE DE VIRUS.

Liquide allantoïque dont le titre hémagglutinant est 1/1.280. Cet inoculat, conservé à -70°C , a été décongelé lors de l'expérimentation. Il s'agit de la souche APR 8.

C) TECHNIQUE D'INOCULATION.

La méthode a été décrite précédemment.

L'incubation fut de 3 heures à 37°C , avant d'ajouter le milieu de culture.

D) RÉSULTATS : TITRAGES DES AGGLUTININES DANS LE LIQUIDE SURNAGEANT — *Tableau I.*

— Le milieu de survie des cultures cellulaires a été entièrement renouvelé lors de chaque titrage.

— Le Tableau I donne lieu aux remarques suivantes :

Quelle que soit la dose de l'inoculat utilisé, les titres hémagglutinants sont restés faibles. Les maxima sont atteints les quatrième ou sixième jours.

L'observation de certains flacons poursuivie pendant plus d'un mois montre que la production d'agglutinines se poursuit de façon irrégulière, les titres obtenus restant faibles (Tableau IV).

Le milieu de survie des flacons observés pendant un long délai a été remplacé, six jours après l'inoculation, par du milieu de croissance contenant 10 pour cent de sérum ; en effet, à cette date la couche monocellulaire présentait des signes de dégénérescence non spécifique. Le changement du liquide surnageant a entraîné la reconstitution totale de la culture cellulaire, permettant l'observation de ces flacons pendant 40 jours.

2. — SUBCULTURES VIRALES

A) SYSTÈME DE CULTURE CELLULAIRE.

Cellules de rein de veau préparées selon la technique habituelle.

B) INOCULATS.

Les inoculats des subcultures virales sont les liquides surnageants des cultures qui précèdent immédiatement.

C'est ainsi que pour le passage N° II, on a utilisé le liquide surnageant de la primoculture, prélevé quatre jours après l'inoculation, de titre hémagglutinant : 1/32.

La mise en route des passages suivants se détaille de la manière suivante :

<i>N° du Passage</i>	<i>Inoculat : Liquide surnageant du passage N°</i>	<i>Prélevé au</i>	<i>Titre Ha</i>
III	II	4 ^e jour ..	1/32
IV	III	4 ^e jour ..	1/16
V	IV	5 ^e jour ..	1/64
VI	V	4 ^e jour ..	1/64
VII	VI	2 ^e jour ..	1/256
VIII	VII	2 ^e jour ..	1/256
IX	VIII	5 ^e jour ..	1/256
X	IX	2 ^e jour ..	1/256

N° du Passage	Inoculat (UHA)	N° des Flacons	Nombre de Jours Suivants l'Inoculation													
			2	4	6	7	8	9	10	12	14	16	18	24	27	
I	32	1	16	16	4				2							
		2	8	16	2				4							
		3	16	64	2				4							
		4	8	8	8				2							
	16	1	4	4	4				4							
		2	8	4	8				2							
		3	4	4	2				2							
		4	8	16	2				4							
	8	1		16	4		1									
		2		16	1		1									
	4	1	8	8	8				2							
		2	8	16	8				8							
		3	8	16	4				2							
		4	8	8	4				2							
		5		4	1		4									
		6	8	64		2										
		7	16	64												
	2	1		32	16		4									
		2		32	16		4									
		3	4	64												
	1	1	2	32												
		2	1	4												
		3	1	64		32		16								
	0,5	1	2	1		1		2	2							
		2	16	32		32		2	4							
		3	4	64		64		8	16							
		4	8	2		8		0	1							
		5	4	16		32		2	2							
	0,25	1	1	1		32		0	0	0	0					
		2	1	1		16		1	0	0	0					
		3	4	32		8		1	0	0	0					
		4	4	16		16		8	1	0	0					
		5	2	1		16		1	2	0	0					
		6	1	32		16		2	2	0	0					
	0,125	1	0	16		64		16	4	0	0		0	2	2	
		2	1	64		128		32	2	0						
		3	1	2		64		128	4	0	0					
		4	2	8		2		2	2	0	0	4				
		5	1	32		32		32	1	0	0	2				
		6	2	16		32		32	2	0	0	0	0	0	2	

Tableau I . PrimoInoculation

Résultats obtenus par inoculation de dilutions de liquide allantoïque infecté par le virus grippal APR 8 sur cellules épithéliales de rein de veau cultivées en couche monocellulaire

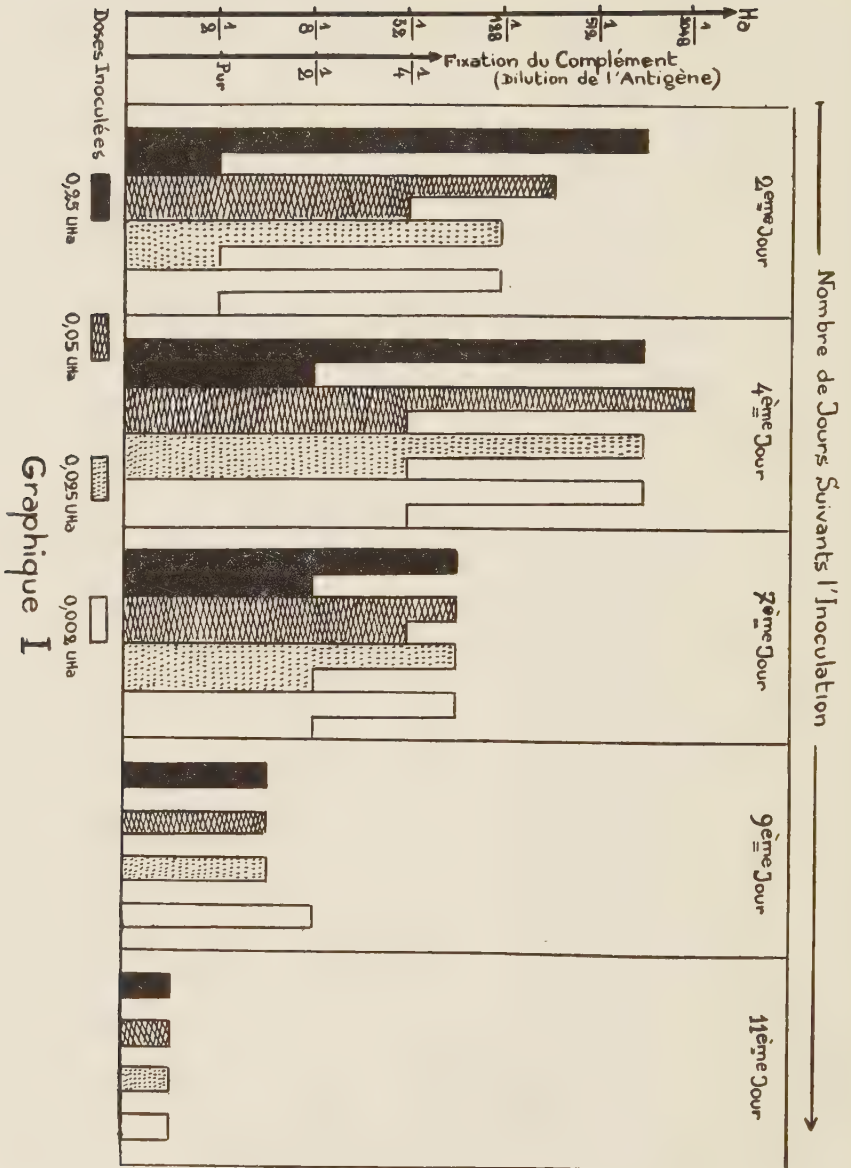
N ^o du Passage	Inoculat (UHa)	N ^o des Flacons	Nombre de Jours Suivants l'Inoculation														
			2	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14	15			
II	32	1		8													
	16	1		1		1											
		2		32													
	8	1		1		4		4									
		2		32		4		4									
		3		128		1		1									
	3	1		32													
	2	1		32													
		2		32													
		3		1													
III	1	1		32													
		2		16													
		3		1													
	0,5	1		16													
		2		3													
		3		0													
	0,3	1		8													
	0,03	1		8													
	0,003	1		0													
		1		16		64											
IV	12	1		16		64											
		2		16		16											
		3		64		64											
	3	1	0	2		2							2				
		2	0	0		4							4				
		3	0	2		2											
	1	1		8		16											
		2		8		32											
		3		1		2											
	0,3	1	0	0		1											
V		2	0	16		8											
		3	0	4		1											
	0,1	1	2		64		4		0		0		2		1		
		2	2		16		4		0		0		1		0		
		3	1		16		0		0		0						
	0,06	1	0	8		32		8	0		0						
		2	0	8		64		4									
		3	0	0													
	0,01	1	0		16		0		0		0		0	0			
		2	0		16		2		0		0		1	4			
		3	0		16		0		0		0		2	1			

Tableau II . Subcultures Virales

N° du Passage	Inoculat (UHa)	N° des Flacons	Nombre de Jours Suivants l'Inoculation															
			2	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	17	28	30		
VI	6,4	1	256		64		8					0						
		2	256		64		4			1		0						
		3	128		64		4			2		0						
		4	128		64		4			0		0						
		Fix. Cplmt	PUR		1/2		PUR			0								
	0,6	1	128		64		4					1						
		2	128		64		16			2		1						
		3	64		64		4			1		0						
		4	64		128		8			2		0						
		Fix. Cplmt																
VII	2,5	1	256	64		16		2				0			0	0		
		2	256	128		16		2				0			1	0		
		3	256	64								0						
		4	256	64		16		1				0			1	0		
		Fix. Cplmt	1/2	1/4		PUR		0										
VIII	0,25	1	0		128		32		16						1			
		2	0		64		8		16						1			
		Fix. Cplmt	0		1/2													
	0,05	1	0		64		16		64						4			
		2	0		256		16		8						2			
		Fix. Cplmt	0		1/2													
	0,025	1	0		256		64		8						2			
		2	0		64		128		64						4			
		3	0		256		32		16						2			
		4	0	128	128	16	32	2	1						1			
		Fix. Cplmt	0		1/2													
IX	0,25	1	128	512		64			4		2				0			
		2	256	512		64			4		1				0			
		3	128	512		64			4		1				0			
		Fix. Cplmt	1/2	1/4		PUR			0									
	0,05	1	64	512		128			4		2				0			
		2	32	512		128			8		1				0			
		3	64	512		128			4		1				0			
		Fix. Cplmt	0	1/2		1/2			PUR									
	0,025	1	128	256		64			4		1				1			
		2	64	256		32			2		0				0			
		3	64	256		256			4		1				1			
		Fix. Cplmt	0	1/4		PUR			0									
X	0,25	1	1024	256			32		4		1		0					
		2	1024	1024			64		2		1		0					
		3	512	256			32		4		1		0					
		Fix. Cplmt	PUR	1/2			1/2											
	0,05	1	256	2048			32		4		0		0					
		2	256	512			64		2		1		0					
		3	256	2048			32		2		1		0					
		Fix. Cplmt	1/2	1/4			1/4											
	0,025	1	128	512			32		2		0		0					
		2	128	512			32		4		1		0					
		3	128	1024			64		2		1		0					
		Fix. Cplmt	PUR	1/4			1/2											
	0,002	1	128	1024			64		4		1		0					
		2	64	1024			32		8		1		0					
		3	128	1024			64		4		1		0					
		Fix. Cplmt	PUR	1/4			1/2											

Tableau III Subcultures Virales

Résultats des subcultures réalisées à partir des primocultures de liquide allantoïque sur cellules épithéliales de rein de veau.



Evolution des titres hémagglutinants et fixant le complément obtenus par culture d'une souche de virus grippal APR 8, adaptée aux cellules épithéliales de rein de veau.

Les dilutions sont faites en utilisant comme diluant du liquide de survie sans sérum.

C) TECHNIQUE D'INOCULATION.

Elle a été réalisée de la manière suivante :

- Elimination du milieu de survie.
- Lavage avec la solution saline de HANKS.
- Introduction de l'inoculat (1 ml/flacon).
- Incubation : 1 heure à 37° C.
- Rejet de l'inoculat.
- Addition du milieu de survie.

D) OBSERVATIONS DES FLACONS.

- Sur le liquide surnageant.

Titrage des hémagglutinines.

Titrage des antigènes fixant le complément. Ce titrage est effectué sur le mélange des liquides surnageants des flacons ayant reçu le même inoculat. La réaction a été faite en face d'un sérum tardif d'un malade atteint de grippe.

- Examen de la couche monocellulaire au microscope, au faible grossissement.

E) RÉSULTATS.

a) Les résultats des titrages des hémagglutinines et des anticorps fixant le complément sont rassemblés dans les tableaux II et III.

b) Examen de la couche monocellulaire.

Jusqu'à la cinquième subculture, il n'est pas possible d'observer un effet cytopathogène net. Seules quelques cellules isolées présentent une vacuolisation discrète du cytoplasme, mais les flacons témoins montrent les mêmes particularités, avec la même intensité.

A partir de la cinquième subculture, on observe l'effet cytopathogène décrit en détail dans la thèse de COLETTE J. (Lyon, 1961). Cet effet cytopathogène n'atteint qu'une fraction encore peu importante de la population cellulaire, le reste des cellules présentant un aspect strictement normal.

Cet effet cytopathogène augmente en intensité à mesure que sont réalisés les passages : c'est ainsi qu'au dixième passage la destruction cellulaire n'épargne que quelques cellules isolées ou en petits groupes.

c) Remarques :

1 — Il est à noter que la valeur des titres hémagglutinants et que l'intensité de l'effet cytopathogène ne dépendent pas de la dose de l'inoculat : au dixième passage, par exemple, l'effet destructeur quasi total des cellules est atteint au quatrième jour avec un inoculat de 0,002 UHa. La production d'hémagglutinines est à son maximum le deuxième jour (1/1.024).

2 — En ce qui concerne l'évolution de la courbe de libération des hémagglutinines selon les passages, on doit noter :

Jusqu'au cinquième passage, on observe une production réduite d'hémagglutinines, cette production étant étalée dans le temps.

Le cinquième passage constitue un point particulier : en effet, on observe non seulement une augmentation sensible des taux hémagglutinants, perceptible dès la quarante-huitième heure après l'inoculation, mais encore un raccourcissement dans la durée de libération des agglutinines, qui se trouve réduite à une semaine.

A partir du sixième passage, la production d'hémagglutinines augmente de façon encore plus importante : les taux au deuxième jour sont très élevés (1/256). En revanche, la période pendant laquelle les agglutinines sont libérées est raccourcie : elle n'est plus désormais que de 48 heures à 3 jours.

Les taux maxima sont obtenus, selon la valeur des inoculats, au deuxième jour ou au plus tard au cinquième jour.

Il est à noter à ce sujet que la huitième subculture présente des titres hémagglutinants maxima au cinquième jour, mais les inoculats utilisés lors de cette série de subcultures étaient nettement moins riches en particules virales que ceux employés au cours des passages précédents.

L'adaptation de la souche est manifeste dès ce moment, car la réponse virale est désormais régulière, quelle que soit la valeur de l'inoculat.

3 — On doit noter enfin que les antigènes fixant le complément existent à des titres importants ; les taux les plus élevés sont atteints une fois la production d'hémagglutinines et l'effet cytopathogène passés par leur maximum.

4 — La figure 1 montre l'évolution, dans les jours qui suivent l'inoculation, des titres hémagglutinant et fixant le complément des liquides des cultures cellulaires inoculées avec la souche adaptée (passage X) en fonction de la valeur de l'inoculat.

CHAPITRE III

DISCUSSION

Le problème le plus important que soulève l'expérimentation que nous avons réalisée réside dans l'explication des phénomènes qui se déroulent au cours de la primoculture et des trois subcultures suivantes. Nous avons vu en effet que, s'opposant aux six derniers passages, ces cultures montraient des caractères bien particuliers :

La couche monocellulaire ne paraît pas présenter de lésion cytopathogène au microscope au faible grossissement.

Les hémagglutinines libérées dans les milieux surnageants ont des titres qui demeurent toujours faibles ; par ailleurs, leur production se poursuit de façon irrégulière durant les semaines qui suivent l'inoculation.

Une telle situation peut résulter soit de propriétés particulières de la couche monocellulaire, soit encore de propriétés particulières de l'inoculat.

I. — ROLE DE LA CULTURE CELLULAIRE DANS L'ADAPTATION DE LA SOUCHE DE VIRUS

Le problème posé par la couche monocellulaire est essentiellement celui de sa réceptivité au virus grippal.

On doit rappeler qu'un virus, pour se multiplier dans une cellule sensible, doit tout d'abord être adsorbé sur la cellule, puis pénétrer à l'intérieur de celle-ci. A ce moment survient la phase d'éclipse du virus, suivie de l'apparition de nouvelles particules virales qui sont libérées dans le milieu de culture. Une anomalie dans le comportement cellulaire pourra donc intervenir à chacune des phases du cycle de la reproduction virale.

Le premier temps du cycle de la reproduction virale est représenté par l'adsorption du virus sur la cellule. Ce phénomène s'effectue selon des modalités variables.

En ce qui concerne les cellules sensibles à un virus donné, la quantité de virus qu'elles sont capables de fixer dépend essentiellement de la nature de la cellule envisagée. Les études à ce sujet ont été surtout conduites en utilisant le virus poliomyélitique.

La fixation du virus, pour certaines cellules pleinement sensibles, telles que les cellules Hela, est réalisée de façon solide et n'est pas suivie d'élution spontanée. Le virus, dans ces conditions, après avoir pénétré dans la cellule, entre rapidement dans la phase d'éclipse (55).

Les cellules rénales de singe sont elles aussi, connues pour leur sensibilité au virus poliomyélitique. Mais on constate, dans ce cas, d'importantes variations selon l'espèce animale qui a servi à préparer les cultures cellulaires. C'est ainsi que KAPLAN et MELNICK (37) montrent que les cellules de rein de singe capuchin peuvent être infectées avec du virus poliomyélitique 1, avec production de nouveaux virus ; mais qu'il n'existe pas dans ce cas d'effet cytopathogène visible.

KAPLAN (37) montre qu'en réalité une faible partie des particules virales contenues dans l'inoculat a été fixée par la couche monocellulaire ; en outre, cette adsorption n'a été réalisée que sur 1 cellule sur 2.000. Ce sont ces quelques cellules qui assurent la reproduction du virus. Dans ces conditions, la perte du pouvoir cytopathogène du virus pour ce système de culture n'est qu'apparente ; celui-ci existe bien, mais ne peut être décelé en raison de sa dispersion et de sa rareté au sein d'une population cellulaire par ailleurs normale.

En ce qui concerne les cellules réfractaires au virus, on constate, selon les souches cellulaires, que l'adsorption en général est inexistante. Dans certains cas cependant, la fixation a bien lieu, mais celle-ci peut ne revêtir qu'un caractère transitoire car une élution spontanée survient rapidement (39). Ainsi en est-il des cellules rénales de lapin et des cellules L, qui, bien qu'étant capables de fixer le virus, le font de manière imparfaite (55).

Dans d'autres cas en revanche, l'adsorption est réalisée de façon solide, il n'y a pas élution, et le virus n'entraîne aucune action cytopathogène, mais il ne peut se multiplier. Ainsi en est-il du virus ourlien adapté à l'œuf et inoculé à une culture de cellules L.

Qu'il y ait ou non fixation du virus sur les cellules réfractaires, celui-ci ne peut entrer dans la phase d'éclipse.

Il ressort des travaux de HOLLAND et Mc LAREN (32) que la propriété que possèdent les cultures sensibles d'adsorber un virus et de rendre possible ultérieurement sa multiplication, réside dans la présence de récepteurs spécifiques dans la paroi cellulaire. Ces récepteurs seraient dans le cas du virus poliomyélitique, constitués par une lipoprotéine.

L'importance des récepteurs de la paroi cellulaire dans l'infection des cellules par le virus grippal est bien connue. On a pu démontrer que les récepteurs de cellules cultivées *in vitro* et sensibles au virus grippal accusaient une diminution notable de leur sensibilité, lorsque les cellules étaient soumises à un traitement préalable à l'inoculation par le RDE ('). Cette perte de sensibilité est permanente dans le cas de cultures cellulaires ; elle est en revanche transitoire lorsqu'elle est réalisée en œuf embryonné, car dans ce dernier cas les récepteurs sont reconstitués après un certain délai (57).

La paroi cellulaire représente donc pour un virus un obstacle qui, dans certains cas, ne peut être franchi. Il est démontré toutefois que, si le seul RNA du virus est utilisé, l'infection de la cellule même réfractaire au virus complet peut être réalisée avec comme résultat une production de particules virales complètes infectieuses (32).

Si le rôle de la paroi cellulaire dans les phénomènes qui conditionnent l'infection de la cellule apparaît primordial, il ne constitue cependant pas le seul facteur à prendre en considération. En effet, des cellules de nature différente, mais possédant des pouvoirs d'adsorption identiques vis-à-vis d'un virus donné, sont capables de produire des réponses virales différentes. C'est ainsi que les cellules rénales de singe patas et de singe rhésus adsorbent le virus poliomyélitique à un même degré ; pourtant le nombre de plages qui apparaissent sur les couches monocellulaires se montre beaucoup plus important dans le cas des cellules rénales de singe patas (34).

RDE = Receptor Destroying Enzym.

Certaines cellules d'un système cellulaire peuvent être résistantes à un virus. Ce fait est d'observation courante. Dans certains cas, il s'agit de cellules résistantes qui ont été sélectionnées par l'action destructrice du virus (64). On a pu montrer que, dans de telles éventualités, les cellules résistantes peuvent néanmoins être infectées par le virus ; mais, dans ce cas, elles ne se divisent que quelques fois seulement et dégènèrent ensuite, libérant ainsi le virus.

Il est possible de débarrasser la cellule résistante du virus qu'elle contient, en la cultivant dans un milieu contenant un anti-sérum spécifique. Dans ce cas, les cellules deviennent résistantes à une nouvelle infection par le même virus, et ce caractère de résistance deviendrait héréditaire. (PUCK-CIECURA) (70).

Dans d'autres cas, la résistance totale de la cellule représente un caractère génétique d'emblée.

C'est ainsi que DARNELL en 1959 (14) isole des clones à partir d'une culture de cellules Hela dont les comportements vis-à-vis du virus poliomyélitique sont totalement différents les uns des autres : certains fournissant 10 fois plus de plages que d'autres. L'auteur démontre qu'il ne s'agit pas en l'occurrence de différences inhérentes au phénomène d'adsorption, mais bien plutôt à certaines propriétés de la cellule, qui ne peut assurer les autres étapes du cycle de reproduction virale.

Des faits semblables ont été rapportés par d'autres auteurs (49) qui utilisent les cellules HEP 2, mises en contact avec du virus rougeoleux. Certains clones cellulaires de cette souche se montrent résistants tout en libérant une très faible quantité de virus.

La conclusion pratique de ce qui précède est que l'on doit, pour obtenir une population cellulaire sensible à l'action de certains virus, établir des clones cellulaires.

Le cycle de développement du virus peut être affecté à un stade avancé, alors même que certains de ses constituants sont déjà formés.

HENLE et coll. (30) montrent que le virus grippal inoculé à des cellules Hela entraîne un effet cytopathogène ; mais il n'y a pas production de particules virales infectieuses. Pourtant on décèle dans le liquide de culture la présence d'hémagglutinines et d'anti-

gènes fixant le complément. Ces deux constituants du virus ont bien été synthétisés par la cellule, car le phosphore radioactif contenu dans le milieu est décelé dans l'hémagglutinine.

Une situation analogue est retrouvée dans le cas de cellules d'EHRlich infectées à l'aide du virus de la maladie de Newcastle. Ici encore, des constituants du virus sont formés, aboutissant à la production de particules virales incomplètes.

Peut-on, d'après ce qui vient d'être dit, interpréter le groupe de résultats recueilli lors des quatre premières subcultures ?

L'éventualité du cycle de développement du virus incomplet semble devoir être éliminée, tout au moins pour une grande part. En effet, non seulement il n'est pas possible d'observer d'effet cytopathogène d'ordre dégénératif, mais encore le virus, dont nous titrons l'activité hémagglutinante dans le liquide de culture, présente un pouvoir infectieux. Les phénomènes que nous observons pourraient dans ce cas résulter de la présence au sein de la couche monocellulaire de quelques cellules seulement sensibles au virus grippal, les autres étant réfractaires. En effet, les cellules se montrent contaminées de façon permanente pendant une longue période d'observation ; par ailleurs, les cellules, une fois mises en subcultures, continuent à libérer du virus en petite quantité.

Une expérimentation concernant l'observation prolongée de cultures cellulaires inoculées avec du liquide allantoïque a été conduite de la façon suivante.

Le système cellulaire et la souche virale utilisés sont les mêmes que ceux décrits lors de la primoculture. La technique est identique.

Les flacons de 75 ml ont étéensemencés avec 1/4 ou 1/2 UHa.

L'observation est poursuivie pendant 16 jours. Au bout de ce délai, la culture ensemencée avec 1/4 UHa a été repiquée après décollement des cellules à l'aide du complexon, ce qui a permis de préparer trois flacons de subcultures. L'observation des flacons s'est poursuivie pendant 40 jours.

Les résultats sont consignés dans le tableau IV, en ce qui concerne les titrages des hémagglutinines.

TABEAU IV

<i>Inoculat</i>	<i>Nombre de jours suivant l'inoculation</i>															
	4	6	8	10	12	14	16		19	21	25	28	31	35	38	40
1/2 UHA = 1/32	1/2	1/2			0	1	1		1	0	1	0	1			
								.. N° 1	= 0	1/4	1/4	0	0	0	0	1/8
1/4 UHA = 1	0	1/2	1	0	1	1/2		.. N° 2	= 0	1/4	1/2	0	0	0	0	1/8
								.. N° 3	= 0	1/4	1/4	0	1/4	0	1/2	1/4

Cette expérience serait donc en faveur d'une population cellulaire constituée en majorité par des cellules résistantes. En réalité, le repiquage de ces cultures donnent lieu à des constatations variables, comme d'ailleurs les couches monocellulaires reconstituées après destruction partielle par le virus, au moment où celui-ci commence à être adapté.

1°) Dans certains cas, les cultures cellulaires, bien que n'ayant aucun titre hémagglutinant dans le liquide et aucune altération cellulaire, possèdent néanmoins un pouvoir infectieux.

Ceci est prouvé par l'expérimentation suivante :

Deux flacons ayant eu une évolution comparable au cours du passage n° VI ont été choisis, treize jours après leur inoculation. A cette date les liquides surnageants ne contenaient pas d'hémagglutinine décelable. La couche monocellulaire, en partie détruite par l'inoculat viral, était alors redevenue continue, et ne montrait à l'observation au faible grossissement aucune lésion cytopathogène. L'expérimentation a donné lieu aux temps suivants :

1) Préparation des microbroyats cellulaires :

— Les cellules sont lavées à trois reprises avec la solution de HANKS. Un titrage des hémagglutinines du dernier produit de lavage donne un résultat nul.

— La couche monocellulaire est décollée des parois du flacon par contact avec le complexon, pendant 20 minutes à la température de 37° C.

— La couche monocellulaire est alors dissociée par pipetages répétés.

— La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée à froid pendant 10 minutes à 3.000 tours/minute.

— Le surnageant du produit de centrifugation est rejeté, après titrage des hémagglutinines ; le titre obtenu étant nul.

— Le culot de centrifugation est remis en suspension dans 5 millilitres de solution de HANKS.

— Cette suspension est microbroyée pendant 3 minutes, puis centrifugée pendant 30 minutes à raison de 3.000 tours/minute, dans une centrifugeuse réfrigérée.

— Le surnageant de cette dernière centrifugation est utilisé comme inoculat ; le titrage des hémagglutinines de cette suspension donne un résultat nul.

2) Inoculation du microbroyat cellulaire à l'œuf embryonné :

Quatre œufs embryonnés de 11 jours ont été inoculés par la voie allantoïque, selon la technique classique. Deux œufs ont été inoculés avec l'inoculat non dilué, deux autres l'étant avec une dilution au 1/100 du même inoculat (0,2 ml/œuf). Les liquides allantoïques sont recueillis après 48 heures et les hémagglutinines sont titrées. Le premier lot hémagglutine à une dilution de 1/5.120, le deuxième à une dilution de 1/10.240.

Le produit de microbroyage de la couche cellulaire présente donc un pouvoir infectieux marqué, alors même que le liquide surnageant ne possédait aucun pouvoir hémagglutinant. L'expérience est toutefois incomplète, car il eut fallu titrer de façon précise le pouvoir infectieux sur œuf incubé non seulement du broyat de cellules, mais encore du liquide de culture.

Il apparaît dans ces expériences que les cellules qui n'ont pas été atteintes par l'effet cytopathogène ne sont pas des cellules complètement résistantes. Elles présentent une modalité d'infection d'un caractère particulier.

2°) Mais il convient de noter que toutes les couches monocellulaires reconstituées ne donnent pas lieu aux mêmes constatations. Il arrive comme précédemment que la couche régénérée ne

présente pas d'effet cytopathogène, et qu'à aucun moment le liquide de culture devienne hémagglutinant. Dans ce cas, la réinoculation montre qu'il ne s'agit pas de cellules résistantes ; l'expérience suivante en témoigne :

Six flacons de la sixième subculture virale ont été choisis. Les observations concernant les lésions cytopathogènes et la production d'hémagglutinines au sein de ces cultures cellulaires infectées ont été précédemment décrites. Douze jours après leur inoculation, les cultures cellulaires étaient indemnes de lésion et le liquide surnageant ne contenait pas d'hémagglutinine.

Ces cultures cellulaires régénérées ont alors été inoculées avec 6,4 UHa, l'inoculat étant le liquide surnageant d'un flacon de la cinquième subculture virale, prélevé au deuxième jour, ayant un titre hémagglutinant de 1/64. Ce liquide a été conservé à — 20° C jusqu'au moment de son utilisation. La technique d'inoculation a été celle employée pour toutes les subcultures virales.

Parallèlement, deux flacons témoins de la sixième subculture virale, c'est-à-dire des flacons vierges, étaient alorsensemencés avec le même inoculat.

L'observation au faible grossissement des cultures cellulaires a montré que, si l'effet cytopathogène se manifestait de façon habituelle sur les deux cultures cellulaires témoins, cet effet était par contre beaucoup moins marqué en intensité sur les cultures cellulaires réinoculées.

Le titrage des hémagglutinines des liquides surnageants a donné lieu aux remarques suivantes :

En ce qui concerne les cultures cellulaires témoins, les titres obtenus au deuxième jour sont de 1/128, et le sixième jour ils sont encore de 1/16.

En revanche, ceux obtenus sur les cultures cellulaires réinoculées ne sont que de 1/4 les deuxième jour et quatrième jour, et le sixième jour ces titres hémagglutinants sont nuls.

Ces faits montrent que le système cellulaire régénéré, bien qu'étant demeuré réceptif, ne possède pas les mêmes propriétés que

les cellules neuves vis-à-vis de la souche virale adaptée au tissu. Tout se passe comme dans le cas d'une culture cellulaire vierge mise au contact d'un inoculat constitué par du liquide allantoïque.

Il ressort donc de ces différents groupes d'expériences que chacun des deux éléments en présence, virus et culture cellulaire, est capable d'avoir le rôle prépondérant dans la production du phénomène.

Certains font intervenir dans ces cas l'état physiologique des cellules constituant la culture :

Une culture cellulaire représente un substrat dont les caractères sont parfois extrêmement variables d'un jour à l'autre ; c'est ainsi que l'on a pu montrer (20) qu'une culture de cellules rénales différenciées aboutissait au bout de quelques jours à une population entièrement différente de celle qui existait à l'origine.

Certains estiment qu'à un moment donné il n'existe qu'une partie de la population cellulaire se trouvant dans un état physiologique qui réalise les conditions de réceptivité au virus.

C'est ce mécanisme qu'invoquent TAKEMOTO et HABEL (60) pour expliquer les résultats de leur expérimentation. Ces auteurs infectent des cellules Héla avec le virus coxsackie A 9 et constatent que la culture présente des altérations cellulaires. Ils ajoutent alors du milieu neuf : les cellules retrouvent leur aspect normal et prolifèrent tout en libérant du virus.

C'est ce mécanisme également qu'invoquent DEINHARDT et coll. (16) pour rendre compte de l'infection persistante de cellules MNC par le virus de la maladie de Newcastle.

Cet état physiologique de la cellule dépend essentiellement des conditions dans lesquelles la culture cellulaire a été cultivée.

Une expérience de GINSBERG (22) tend à démontrer le rôle de la nutrition cellulaire dans les phénomènes d'infection continue des cellules. Cet auteur, cultivant les adénovirus type 3 et 4 sur les cellules Hela contenant 40 pour cent de sérum humain, ne constate aucun effet cytopathogène.

En revanche, si la culture est réalisée avec un milieu sans sérum, la destruction typique de la couche monocellulaire apparaît. L'interprétation fournie dans ce cas est que le sérum maintient la cellule dans un état physiologique tel que celle-ci est devenue résistante au virus.

D'autres expériences tendent à réaliser l'épreuve inverse, en créant un état déficient de la cellule, par entretien de celle-ci dans des milieux de culture pauvres. La cellule, primitivement réfractaire, devient sensible. C'est ainsi que HARE et MORGAN (26) cultivent des cellules embryonnaires de poulet dans un milieu contenant uniquement une solution saline tamponnée glucosée, et montrent que le système cellulaire devient réceptif au virus de la psittacose. La même expérience est réalisée par MORGAN et BADER (49) avec la souche L de fibroblastes de souris.

Inversement, une cellule primitivement sensible peut devenir réfractaire : c'est ainsi que des cellules L entretenues dans un milieu où manquent certains acides aminés et certaines vitamines hydrosolubles, ne peuvent plus assurer la multiplication du virus herpétique (52). Il convient de noter toutefois que l'état de sensibilité ainsi créé n'est que partiel ; le cycle de reproduction du virus ne dépasse pas dans ces deux éventualités la phase d'éclipse, si un milieu contenant des vitamines et des acides aminés n'est pas utilisé (36).

L'état physiologique de la cellule permettant l'accomplissement du cycle entier de multiplication du virus peut dépendre dans certains cas d'une carence en certains constituants du milieu de culture, en particulier des acides aminés ; cette carence se montrant simplement capable d'inhiber la multiplication de la cellule ainsi que celle du virus. Si cet état est suffisamment prolongé, le virus disparaît de la cellule ; si l'on ajoute le milieu complet, la cellule reprend sa prolifération (65).

Une élimination des acides aminés du milieu nutritif entraîne comme conséquence une diminution ou même une disparition de certains acides aminés de la cellule (53).

Inversement, l'addition de certains acides aminés peut favoriser la multiplication du virus : l'augmentation de la concentration en arginine entraîne par exemple une destruction très rapide des

cellules KB par l'adénovirus 2 (4). De même, l'addition de certains acides aminés au milieu utilisé pour l'entretien des membranes chorioallantoïques d'œufs désémbryonnés infectés par le virus grippal B, favorise la production de particules virales (43).

DARNELL et EAGLE (14), expérimentant avec le virus poliomyélitique cultivé sur cellules Hela, montrent que l'élimination de la vitamine B 6 du milieu inhibe la multiplication du virus. D'autres auteurs (41) mettent en évidence que la déficience en vitamine B 6 a comme conséquence la disparition dans la cellule de certains acides aminés indispensables à la synthèse du virus.

Tous les milieux de cultures utilisés en virologie contiennent du bicarbonate de soude. Certains ont constaté que la diminution de la concentration en bicarbonate de soude était accompagnée d'une diminution de la production virale.

Ainsi le virus poliomyélitique est produit en quantité moindre sur les cellules de rein de singe (64) ; le virus coxackie B 1 prolifère de façon moins active sur les cellules Hela (8).

On a cru tout d'abord que cette inhibition partielle de la croissance virale était due à l'abaissement de pH de la culture ; pourtant le rajustement du pH à l'aide d'une solution de soude n'est pas suivi d'une amélioration du rendement (34). En réalité, le rôle du bicarbonate apparaît dans ce cas tout à fait différent de celui qui lui est ordinairement attribué. En effet, CHANG (8) montre qu'il intervient dans la synthèse des acides nucléiques. L'auteur avance comme preuve que l'addition de purine et de pyrimidine compense le déficit créé en bicarbonate ; de même l'addition d'acide ribonucléique est capable de supprimer l'inhibition de la production de virus entraînée par la diminution de la concentration du milieu en bicarbonate. CHANG estime que le bicarbonate est indispensable à la cellule pour lui permettre de synthétiser certains équipements enzymatiques indispensables dans le métabolisme des acides nucléiques et par conséquent pour la synthèse des particules virales.

Outre les modifications que peuvent entraîner les variations de la composition du milieu de culture, il convient également d'envisager le rôle que pourraient éventuellement jouer des substances inhibitrices vis-à-vis du virus grippal. Ces substances, fixant le virus, empêcheraient celui-ci d'être adsorbé sur les récepteurs de la paroi cellulaire (23).

Cette possibilité doit être envisagée sous deux aspects différents : d'une part, celui qui a trait au mélange d'acides aminés et de vitamines que l'on utilise, et d'autre part, celui qui concerne la nature du sérum additionné dans le milieu de croissance ou le milieu d'entretien.

Nous avons utilisé le milieu préparé à partir d'hydrolysate de lactalbumine. Or certains auteurs (67) ont montré que ce milieu était capable d'entraîner une inhibition de la croissance de certains virus : avec le virus de la maladie nodulaire des bovidés, une concentration d'hydrolysate de lactalbumine inférieure à 2 pour cent doit être réalisée pour ne pas modifier le comportement du virus à l'intérieur de la cellule.

En ce qui concerne l'étude de l'influence des milieux de croissance et de survie sur la production du virus grippal, l'expérimentation réalisée est la suivante :

Une trypsination a donné lieu à la réalisation de plusieurs séries de flacons, dont les milieux de croissance et de survie ont été différents :

Le milieu de croissance utilisé pour le lot n° 1 a été le milieu de EAGLE supplémenté avec 10 pour cent de sérum de cheval.

Un deuxième lot a été constitué avec des cellules mises en suspension après trypsination dans un milieu à l'hydrolysate de lactalbumine (0,25 pour cent) additionné de 1 pour cent d'extrait de levure et de 10 pour cent de sérum de cheval.

Le premier lot a reçu comme milieu d'entretien du milieu de EAGLE contenant 3 pour cent de sérum de cheval.

Le deuxième lot a été divisé en trois séries de flacons ; l'une a été entretenue avec du milieu à l'hydrolysate de lactalbumine à 0,50 pour cent.

Une autre a reçu du milieu d'entretien représenté par de l'hydrolysate de lactalbumine à 0,25 pour cent.

La troisième série a reçu le même milieu, mais contenant 0,10 pour cent de lactalbumine.

Les milieux de croissance ont été renouvelés tous les trois jours jusqu'à ce que la couche monocellulaire ait revêtu un aspect uniforme. Après l'inoculation, le milieu d'entretien a été renouvelé toutes les 48 heures.

Les inoculats ont été, sous un volume de 1 millilitre, constitués par du liquide allantoïque hémagglutinant à la dilution de 1/1.280, conservé jusqu'à son emploi à — 70° C. Les différentes dilutions utilisées contiennent respectivement : 8, 4, 2, 1, 1/2, 1/4, 1/8 UHa.

La technique d'inoculation a été la même que celle décrite à propos des autres extérieures relatées dans cet ouvrage.

Résultats : Les titres hémagglutinants des liquides surnageants des flacons des diverses séries s'échelonnent entre 1/2 et 1/32. Ces titres sont identiques à ceux qui avaient été relevés lors de la primo-inoculation réalisée précédemment (tableau I). Il n'y a pas eu d'hémagglutination à une dilution supérieure au 1/32, quel qu'ait été le milieu de croissance ou le milieu de survie. De même, nous n'avons pas noté ici encore de variations dans les taux en fonction des inoculats.

Dans ces conditions, il est possible d'avancer que les milieux de croissance et de survie que nous avons utilisés lors de la première phase de l'adaptation de la souche virale n'influent aucunement sur la croissance du virus grippal. Il ne semble pas en particulier que le milieu à l'hydrolysate de lactalbumine contienne des inhibiteurs du virus.

Le milieu synthétique de EAGLE que nous avons utilisé n'est peut-être pas le milieu idéal pour favoriser la multiplication du virus grippal. Une étude spéciale, faisant appel à l'utilisation de milieux synthétiques complexes, serait nécessaire pour déterminer les éventuelles modifications de l'état physiologique de la cellule, ces modifications pouvant rendre la culture cellulaire plus apte à assurer la multiplication du virus.

Nous avons cherché à déterminer l'influence de la nature des sérums contenus dans les milieux de culture sur la production virale. Pour cette expérimentation, la multiplication des cellules rénales de

veau obtenues par trypsination a été réalisée avec du milieu à l'hydrolysate de lactalbumine contenant 10 pour cent de sérum de veau. Lorsque la couche monocellulaire a été continue, les flacons ont été inoculés selon la technique précédemment décrite. L'inoculat, d'un volume de 1 millilitre par flacon, est le liquide surnageant d'un flacon du neuvième passage, prélevé quatre jours après l'inoculation, hémagglutinant à la dilution de 1/512, conservé à — 20° C jusqu'au moment de son utilisation.

Après incubation, les flacons sont divisés en deux lots. Le milieu de survie utilisé pour le premier lot est du milieu à l'hydrolysate de lactalbumine contenant 3 pour cent de sérum de veau ; le milieu utilisé pour le deuxième lot contenant 3 pour cent de sérum de cheval. A chacun des lots de flacons inoculés correspond en outre un lot de flacons témoins, non inoculés.

Les titrages des hémagglutinines dans les liquides surnageants, effectués 48 heures après l'inoculation, donnent des résultats comparables pour les deux lots de flacons : les liquides surnageants hémagglutinent aux dilutions de 1/64 ou 1/128. A cette date, l'effet cytopathogène se manifeste de façon identique dans tous les flacons inoculés, plus de la moitié des cellules présentant alors un aspect vacuolaire.

A partir du deuxième jour, les milieux de survie furent renouvelés tous les deux jours, et les titres hémagglutinants déterminés à chaque changement de milieu.

L'aspect des cultures cellulaires des flacons témoins, dont les milieux de survie étaient aussi renouvelés tous les deux jours, a été identique pendant toute la durée de l'expérimentation.

A partir du quatrième jour, l'observation des cultures cellulaires des deux lots de flacons inoculés permet de noter une régression progressive des phénomènes cytopathogènes, la reconstitution des couches monocellulaires à partir des cellules non détruites étant totale le douzième jour.

Pendant cette période d'observation, les titres hémagglutinants des liquides surnageants des deux lots de flacons ont subi une évolution parallèle : les liquides hémagglutinants au 1/32 ou au 1/64 le quatrième jour, au 1/4 ou au 1/8 le sixième jour, au 1/2 le huitième jour.

Cette expérimentation apporte la preuve que, dans les conditions où nous nous sommes placés, la nature des sérums qui supplémentent les milieux de survie cellulaire n'intervient pas dans la production d'hémagglutinines.

II. — ROLE DU VIRUS DANS L'ADAPTATION

La cellule, nous l'avons déjà vu, paraît ne pas être la seule en cause dans la production des phénomènes que nous observons lors des primo-inoculations. Le virus lui aussi joue un rôle indiscutable. La première hypothèse qui se présente à l'esprit est que, compte tenu du fait que la couche monocellulaire se montre réceptive de façon quasi complète à un virus qui a subi plusieurs subcultures, le virus contenu dans l'inoculat est incapable de se fixer de façon solide sur l'ensemble de la population cellulaire. Cette action ne concernerait que quelques cellules seulement.

Une expérimentation a eu pour but de vérifier si l'adsorption du virus ne pouvait être modifiée par les conditions de températures lors de l'incubation réalisée après l'inoculation des particules virales sur la couche monocellulaire.

Des flacons de cellules rénales de veau, traitées pour leur croissance et leur survie avec du milieu à l'hydrolysate de lactalbumine, ont été inoculés avec 4 UHa sous un volume de 1 millilitre. Les dilutions ont été faites à partir d'un liquide allantoïque conservé à — 70° C et hémagglutinant à la dilution de 1/1.280.

Ces flacons ont été répartis en deux lots : le premier a été incubé à + 4° C, le deuxième à 37° C. Dans chacun de ces lots, cinq séries de flacons ont été préparées, chaque série ayant une durée d'incubation variable : 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures, 4 heures.

Après addition du milieu de survie, les flacons ont été replacés à l'étuve à 37° C.

L'observation s'est poursuivie pendant les dix jours qui ont suivi l'inoculation.

Le lot incubé à 37° C a reproduit exactement les phénomènes connus, observés lors de toute primo-inoculation. Les titres hémagglutinants n'ont pas été influencés par la durée de l'incubation à 37° C.

Le lot traité à + 4° C a présenté, pour les durées de contact de 3 heures et 4 heures, des phénomènes de dégénérescence d'évolution rapide, et les titres hémagglutinants sont toujours demeurés nuls.

Pour les durées de contact inférieures à 3 heures, les taux d'hémagglutinines relevés ont été du même ordre de grandeur que pour le lot des flacons incubés à 37° C.

On aurait pu croire, par analogie avec ce que l'on observe avec les hématies, que la fixation à + 4° eût été plus solide et eût favorisé au maximum le contact du virus avec les récepteurs cellulaires. En outre, l'élution rapide que l'on observe à 37° C à partir des globules rouges ne s'opère pas à cette température. Enfin, pendant la durée de ce contact, supposé malaisé, entre virus et récepteur, l'inactivation du virus, qui ne manquerait pas d'intervenir à 37° C, se trouve ici supprimée.

Cette expérimentation montre que l'adsorption à froid n'a modifié en rien le comportement du virus vis-à-vis de la cellule. Il eut fallu pouvoir déterminer si le nombre de particules virales fixées à 37° C et à 4° C était identique, et si les particules virales ne s'éluaien pas des cellules, en réalisant un titrage du pouvoir infectieux du virus avant et après l'inoculation à la culture cellulaire. Le nombre d'œufs nécessaires à cette investigation nous a paru trop important.

L'échec de toutes les investigations destinées à étayer les hypothèses faisant intervenir la nature de la cellule, son état physiologique, la capacité d'adsorption du virus, pour expliquer cette phase qui précède l'adaptation de la souche virale, nous amène à envisager un autre mécanisme de la résistance cellulaire, entraîné celui-ci par le virus lui-même.

Le mécanisme généralement invoqué à l'heure actuelle pour rendre compte de l'état réfractaire à un virus donné d'une population cellulaire habituellement sensible, fait intervenir le phénomène d'interférence.

L'interférence peut être définie comme résultant de l'action sur les cellules d'un virus vivant ou inactivé, avec comme conséquence le fait que les cellules deviennent incapables d'assurer la multiplication de virus auxquels elles se montraient sensibles. Il convient de rappeler que l'interférence peut relever de trois mécanismes différents.

Dans une première éventualité, le virus grippal ou encore un virus qui lui est apparenté a subi une inactivation partielle qui lui a conservé son activité enzymatique. Inoculé à un système de culture, ce virus inactivé va pouvoir détruire, grâce à son activité neuraminidasique, tous les récepteurs de la paroi cellulaire. Dans ces conditions, la réinoculation d'un autre virus ne pourra provoquer l'infection de la cellule, car l'adsorption du virus est devenue impossible (61).

Dans un deuxième type d'interférence, le virus grippal inactivé peut inhiber la multiplication du virus grippal strictement homologue, même s'il a été inoculé après le virus actif (62-63).

Dans ce cas, il convient de remarquer que l'interférence est strictement homologue ; en l'outre, l'interférence se produit lorsque le virus inactif est introduit même trois heures après le virus actif. Ces faits montrent d'une part que le phénomène atteint la synthèse d'un constituant spécifique de type du virus, et que d'autre part ce constituant spécifique de type n'a pas encore été synthétisé trois heures après le début de l'infection.

Dans un troisième type d'interférence, le phénomène se manifeste non seulement vis-à-vis du virus homologue, mais encore de virus qui n'ont absolument aucune parenté avec le virus inactif utilisé : il s'agit de l'interférence hétérologue (19).

ISAACS et LINDENMANN (35) ont montré que cette interférence hétérologue était réalisée par une substance à laquelle ils ont donné le nom d'Interféron. On sait à présent qu'il existe plusieurs types de substances possédant les mêmes propriétés d'induire l'interférence (9).

On constate donc que le phénomène d'interférence va dépendre de la nature de l'inoculat et de la nature de la population cellulaire.

1) Nature de l'inoculat : Dans notre expérimentation, l'inoculat est représenté par du liquide allantoïque récolté à la quarante-

huitième heure. Dans ces conditions, ce liquide contient des particules virales actives, des particules virales inactives et de l'interféron.

Durant les 24 premières heures d'incubation, la production de virus est à son maximum ; il n'y a pas production d'interféron. Mais plus tard, lorsque la production de virus décline, de l'interféron est produit : il est le résultat de l'effet du virus spontanément inactivé pendant les 24 premières heures d'incubation à 37° C.

2) Nature de la population cellulaire : On peut supposer également que la culture cellulaire puisse comporter un certain nombre de cellules dans lesquelles la multiplication virale s'opérera de façon partielle, libérant des particules de virus incomplètes, comme dans le cas des cellules Hela. Or il a été prouvé que le virus incomplet peut également induire l'état d'interférence (42) (7).

On peut dans ces conditions imaginer le déroulement des faits suivants :

1) Ces particules virales actives adsorbées sur les cellules sensibles vont donner lieu à la production de particules infectieuses qui vont être libérées dans le milieu de culture.

2) Ces nouvelles particules vont alors trouver devant elles une population cellulaire comprenant :

Des cellules insensibles du fait de leur constitution génétique ;

Des cellules sensibles à l'origine, mais qui se trouvent pour la plupart protégées grâce à l'intervention des phénomènes d'interférence. Ces phénomènes peuvent induire soit une interférence homologue par des particules inactivées ayant ou non conservé leur activité neuraminidasique ; soit encore une interférence par interféron, installée par les particules inactivées contenues dans l'inoculat ou encore par le virus incomplet éventuellement libéré.

Il convient de remarquer que l'état d'interférence homologue ou hétérologue est d'installation relativement rapide. Il faut 10 particules seulement de virus inactivé pour provoquer l'interférence homologue dans une cellule. Un délai de 12 à 14 heures est nécessaire pour entraîner l'état réfractaire, mais cette interférence n'est réalisée que dans la cellule où s'est fixé le virus inactivé.

L'interférence hétérologue par l'intermédiaire de l'interféron est au contraire étendue à toute la culture. Comme dans le cas précédent, l'état réfractaire nécessite un certain délai pour son instal-

lation, mais en outre l'incubation prolongée à 37° C contribue à augmenter la résistance entraînée par l'interféron. Par ailleurs, il est à noter que la cellule ainsi protégée est capable de fixer du virus actif. Ce dernier aura pour effet d'intensifier la production d'interféron. Il faut remarquer à ce sujet que le degré de l'interférence est totalement indépendant de la dose de virus actif inoculée. En revanche, la protection réalisée par l'interféron ne se montre que passagère, n'excédant pas quelques jours, si l'apport d'interféron se trouve supprimé.

Enfin, on doit signaler que l'interféron conserve son activité à des pH aussi acides que pH 2.

Dans ces conditions, l'expérience que nous allons décrire a pour but de vérifier dans quelle mesure les phénomènes d'interférence sont capables d'intervenir lors des premières subcultures. Cette expérimentation a été conduite de la manière suivante :

1) *Cultures cellulaires.*

Cellules rénales de veau dispersées par la trypsine. Les milieux de croissance et de survie sont les milieux à l'hydrolysate de lactalbumine, supplémentés respectivement avec 10 pour cent et 3 pour cent de sérum de veau.

2) *Préparation des inoculats.*

— Virus inactivé : Un mélange des liquides surnageants des cultures cellulaires de la dixième subculture virale a été recueilli quatre jours après l'inoculation. Le titre hémagglutinant de ce mélange est de 1/1.024. Le liquide est réparti en ampoules scellées, qui sont placées à l'étuve à 37° C pendant une période de sept jours avant leur utilisation.

— Virus actif : Mélange des liquides surnageants des cultures cellulaires de la dixième subculture virale, recueillis quatre jours après l'inoculation, hémagglutinant à la dilution de 1/512. Ce mélange est conservé à — 20° C jusqu'à son utilisation.

3) *Expérimentation.*

Les flacons ont été divisés en trois lots :

Les deux premiers lots sont inoculés, selon la technique habituelle, avec le virus inactivé. L'inoculat est utilisé non dilué sous

un volume de 1 millilitre par flacon de 75 ml. Chaque flacon reçoit en outre 4 millilitres de liquide de survie. Tous les flacons sont ensuite placés à l'étuve à 37° C.

Après un temps d'incubation de 12 heures, le premier lot de cultures cellulaires est repris : l'inoculat est rejeté, la couche monocellulaire est lavée avec la solution de HANKS. On introduit alors le virus actif, à une dilution du 1/2, sous le volume de 1 ml par flacon. Les flacons sont alors placés à l'étuve à 37° C pendant une heure, à l'issue de laquelle, après rejet de l'inoculat actif et lavage de la culture cellulaire, on ajoute 7 millilitres de milieu de survie dans chaque flacon avant de les replacer à l'étuve.

Le deuxième lot de cultures cellulaires est traité de façon analogue, la durée de contact du virus inactivé ayant été de 24 heures.

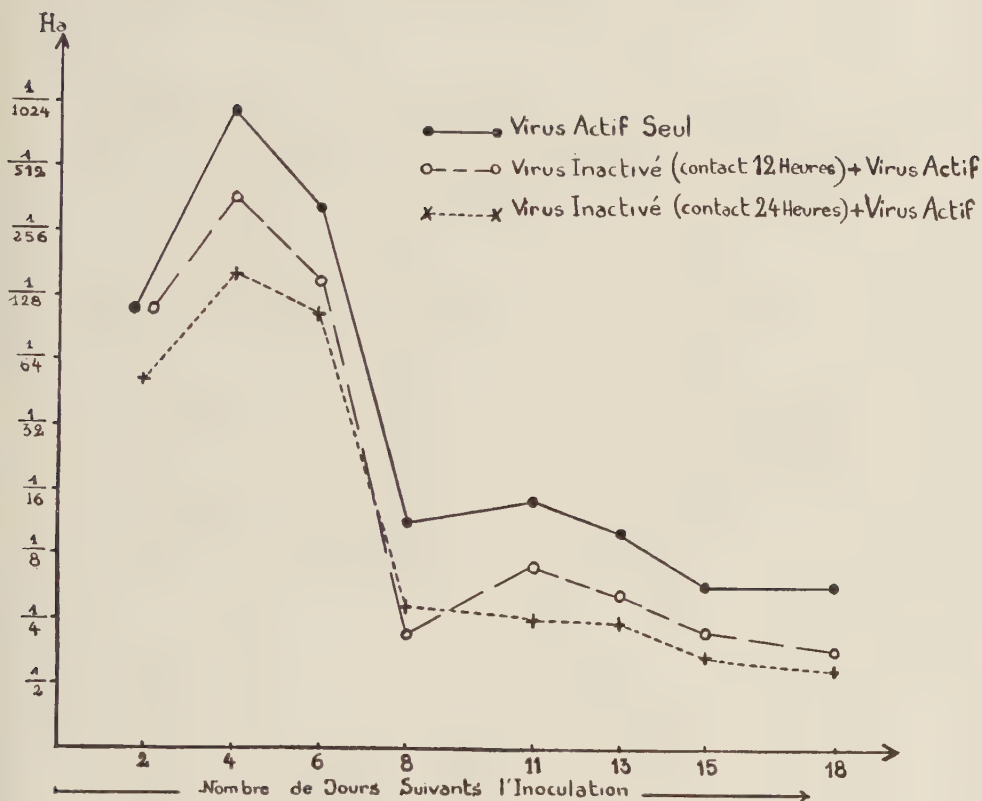
Parallèlement le troisième lot de cultures cellulaires, n'ayant subi jusque-là aucune manipulation, estensemencé avec le virus actif de la même façon que les deux lots précédents.

4) *Observations des cultures cellulaires.*

Les titrages des hémagglutinines des liquides surnageants sont résumés dans la figure 2.

On doit remarquer l'abaissement des titres hémagglutinants après contact du virus inactivé pendant 12 heures. La chute des taux se montre plus sensible encore dans les flacons où le contact a été prolongé pendant 24 heures. Il convient néanmoins de noter que, dans ces deux cas, les titres hémagglutinants obtenus sont nettement supérieurs à ceux qui sont relevés au cours des primo-inoculations réalisées en prenant comme inoculat du liquide allantoïque.

Dans ces conditions, les phénomènes d'interférence peuvent avoir quelque importance au cours de la primo-inoculation, ou des subcultures qui suivent immédiatement, ainsi que le fait remarquer TYRRELL (62) qui aboutit aux mêmes constatations que nous ; mais nous estimons qu'ils ne peuvent à eux seuls expliquer tout le phénomène.



Mise en évidence des phénomènes d'interférence induits dans un système cellulaire préparé à partir du rein de veau, par du virus grippal APR 8 inactivé par la chaleur.

Influence du temps de contact virus inactivé-cellules.

Nous avons été amenés par ailleurs à reconnaître que ni la nature de la cellule, ni la nature du milieu de culture, ne pouvaient être retenues dans le même but. Il faut, dans ces conditions, incriminer le virus lui-même dans le déterminisme des anomalies relevées lors des premiers passages.

Nous avons déjà mentionné l'hétérogénéité de la population virale constituant l'inoculat, en notant que celle-ci contenait à la fois des particules virales actives et inactives. Il convient d'insister maintenant sur l'hétérogénéité de la population virale active.

Les particules virales actives d'une même suspension virale sont loin d'avoir toutes les mêmes propriétés et les mêmes caractères. Ce fait, connu depuis longtemps, a encore été vérifié au sujet du virus grippal A. CHAPIN et TAMM (10) ont montré que le virus A. comportait en réalité deux types de particules : les unes sont sensibles aux inhibiteurs alors que les autres ne le sont pas. Quant aux souches présentant toute la gamme de sensibilité intermédiaire entre ces deux pôles, elles peuvent s'expliquer en considérant qu'il s'agit de mélanges en proportions variables de ces deux types de particules. Dans cette perspective, la propriété constituée par la sensibilité aux inhibiteurs ne peut être considérée comme un caractère fondamental de la souche isolée, mais bien plutôt comme le résultat de modalités d'isolement du virus.

On pourrait croire que l'utilisation d'un clone viral suffirait pour supprimer cette hétérogénéité des suspensions virales. En réalité, les faits démontrent qu'il est loin dans ce cas d'en être ainsi.

Une population virale dérivée d'une seule particule devient elle aussi très rapidement des plus hétérogènes lorsqu'elle est cultivée dans certaines conditions. C'est ainsi que BURNET a pu obtenir un variant avirulent du virus grippal, qui, par les techniques clonales et à la dilution limite, peut conserver tous ses caractères ; mais un ou deux passages à basses dilutions et dans un milieu modifié peuvent remanier les caractères de la souche et lui rendre en particulier sa virulence.

La constatation de tels faits comporte d'ailleurs un certain nombre de conséquences : c'est ainsi qu'une étude génétique d'un virus donné ne sera valable que si chaque manipulation est précédée d'un réisolement du virus avec détermination précise des caractères du nouveau clone.

Quant au déterminisme de cette hétérogénéité, il convient de le rechercher dans la constitution génétique du virus. D'après BURNET, le virus est hétérozygote, et cela expliquerait les difficultés pour obtenir et maintenir un clone pur de ce virus.

L'explication des phénomènes qui se déroulent au cours des premières subcultures pourrait donc être trouvée dans la sélection d'un variant du virus, suivie de l'enrichissement de la culture cellulaire en particules représentant ce variant.

Le problème de l'adaptation d'une souche de virus grippal au système cellulaire représenté par les cellules épithéliales de rein de veau, qui se montrent sensibles au virus, est double :

1) Il convient que le virus actif libéré puisse se fixer à chaque instant sur des cellules sensibles. Ce but peut être atteint en utilisant une grande surface de culture de cellules, soumise à de fréquents changements de milieu, destinés à éliminer l'interféron produit et à maintenir un pH tel que l'inactivation du virus libéré ne puisse intervenir. On peut également atteindre le même objectif en réalisant des subcultures à intervalles très rapprochés.

2) Dans l'un et l'autre cas, on est en droit d'escompter un enrichissement progressif du variant sélectionné.

Notre expérimentation montre que le rendement d'une couche monocellulaire inoculée avec de faibles doses de particules infectieuses est important. On conçoit l'utilisation éventuelle de ce système pour la production de quantités importantes de virus.

Sous réserve que les autres souches de virus grippal de type A ou de type B puissent être aussi aisément adaptées aux cellules de rein de veau, il est aisé de prévoir l'utilisation pratique de ce mode de culture du virus grippal dans la fabrication de vaccin. Cette application paraît possible car le typage du virus APR 8 adapté aux cellules épithéliales de rein de veau a montré que sa constitution antigénique n'avait nullement été remaniée.

CONCLUSIONS

Notre travail retrace les différentes étapes de l'adaptation d'une souche de virus grippal APR. 8 à se multiplier sur un système cellulaire représenté par des cellules épithéliales de rein de veau cultivées en couche monocellulaire.

I. — Cette adaptation se déroule en trois phases distinctes :

1° La première persiste durant quatre subcultures ; elle est caractérisée par les faits suivants :

a) La culture cellulaire ne présente aucune modification macroscopique ou microscopique.

b) Il y a néanmoins libération de particules virales ; en effet, dès le deuxième ou quatrième jour après l'inoculation, le milieu de culture renferme des hémagglutinines et de l'antigène fixant le complément ; mais les titres sont faibles. La production d'hémagglutinines se poursuit sur un mode irrégulier et en quantités toujours peu importantes au cours des semaines qui suivent. Ces deux constituants du virus grippal sont bien les témoins de l'existence de particules virales complètes infectieuses, car le liquide se montre pathogène pour l'œuf de poule incubé, la souris et les cellules épithéliales de rein de veau.

c) La production du virus n'est influencée ni par la concentration de l'inoculat, ni par les modifications apportées dans la composition du milieu de culture et plus spécialement par la nature du sérum utilisé.

2° La deuxième phase est brève ; elle est représentée dans notre expérimentation par la cinquième subculture. Les particularités observées sont les suivantes :

a) On observe un effet cytopathogène, mais celui-ci n'est pas massif ; il épargne une fraction importante de la population cellulaire.

b) Le virus est présent dans le milieu de culture deux jours après l'inoculation, les taux hémagglutinants sont plus élevés que lors de la primo-culture, et la production d'hémagglutinines est limitée à une semaine.

3° La troisième phase est celle de la pleine adaptation du virus au système cellulaire :

— L'effet cytopathogène est massif ;

— Les quantités d'hémagglutinines libérées sont importantes ;

— La production maxima du virus est réalisée pendant une période de courte durée n'excédant pas 48 heures.

Ces phénomènes, en outre, apparaissent très tôt après l'inoculation ; ils peuvent être provoqués par des inoculats très faibles : un inoculat contenant 0,002 unités hémagglutinantes a donné au quatrième jour un liquide hémagglutinant au 1/1.024.

II. — Les particularités rencontrées lors de la première phase de l'adaptation peuvent trouver une explication dans l'hétérogénéité de l'inoculat.

Celui-ci, représenté par du liquide allantoïque, recueilli après 48 heures, contient une population virale constituée par du virus actif, mais aussi du virus inactif responsable de phénomènes d'interférence. Il est probable, en outre, que les propriétés biologiques sont différentes à l'intérieur du groupe des particules actives, certaines d'entre elles seulement étant capables de proliférer sur les cellules épithéliales de rein de veau.

III. — L'ensemencement d'une population cellulaire importante suivi de changements de milieu fréquents ou la réalisation de subcultures à intervalles rapprochés paraissent représenter des conditions favorisant l'adaptation de la souche virale au système cellulaire.

IV. — La souche APR 8, une fois adaptée aux cellules épithéliales de rein de veau, a conservé intacte sa constitution antigénique.

VU :

Le Doyen,
H. HERMANN.

Le Président de Thèse,
P. MONNET.

Vu et permis d'imprimer : Lyon, le 6 octobre 1961.
Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ACKERMANN W.-W., MASSAAB H.-F. : *Jnal Exp. Med.* (1954), 100, p. 329/339.
- (2) BALUDA : *Virology* (1957), 4, p. 72.
- (3) BODIAN D. : *Virology* (1956), 2, p. 575/6.
- (4) BONIFAS V., SCHLESINGER R.-W. : *Fed. Proc.* (1959), 18, p. 560.
- (5) BOURDIN P., ATANASIU P., LÉPINE P., JACOTOT H., VALLÉE A. : *Ann. Inst. Past.* (1957), 93 :5, p. 581.
- (6) BURINSKAÏA A.-E. : *Vopr. Virul.* (1958), 3, p. 162/5.
- (7) BURKE D.-C., ISAACS A. : *Brit. Jnal Exp. Path.* (1958), 39, p. 78.
- (8) CHANG R.-S. : *Jnal Exp. Med.* (1959), 109, p. 229.
- (9) CHANY D. : *Virology* (1961), 13, p. 485.
- (10) CHAPIN, TAMM.
- (11) COLVILLE J.-M., DUNBAR J.-M., MORGAN H.-R. : *Jnal Imm.* (1956), 76, p. 264.
- (12) CRAVEN C. : *Exp. Cell. Res.* (1960), 19, p. 264.
- (13) DANIEL P., DEPOUX R. : *Ann. Inst. Past.* (1957), 92 :5, p. 703/4.
- (14) DARNELL J.-E., EAGLE H. : *Fed. Proc.* (1958), 17, p. 508 ; *Bact. Proc.* (1959), 69, p. 78.
- (15) DEIBEL R., HOTCHIN J.-E. : *Virology* (1959), 8, p. 367.
- (16) DEINHARDT F., BERGS V.-V., HENLE G., HENLE W. : *Jnal Exp. Med.* (1958), 108, p. 573.
- (17) EAGLE H. : *Jnal Exp. Med.* (1955), 102, p. 37 ; 100, p. 595.
- (18) ENDERS J.-F., PEARSON H.-E. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1941), 48, p. 143.
- (19) FAZEKAS DE ST-GROTH S., EDNEY M. : *Jnal Imm.* (1952), 69, p. 160.
- (20) FROTHINGHAM T.-E. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1959), 100, p. 505.
- (21) GADJUSEK D.-C. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1953), 83, p. 621/4.
- (22) GINSBERG H.-S. : *Symposium on latency and masking viral and rickettsial infection*, p. 157. Minnéapolis, 1958.
- (23) GINSBERG H.-S. : *Bact. Rev.* (1960), 24, p. 141.

- (24) GOSTLING J.-V.-T. : *Brit. Jnal Exp. Path.* (1958), 39, p. 679.
- (25) HAAS R., WULFF H. : *Zeit. für. Hyg.* (1957), 143 S, p. 568/77.
- (26) HARE J.-D., MORGAN H.-R. : *Jnal Exp. Med.* (1954), 99, p. 461.
- (27) HEATH R.-B., TYRRELL D.-A. : *Arch. für. Virusf.* (1958).
- (28) HENLE W., ROSENBERG E.-B. : *Jnal Exp. Med.* (1949), 89, p. 279.
- (29) HENLE W. : *Jnal Exp. Med.* (1949), 90, p. 13.
- (30) HENLE G., GIRARDI A., HENLE W. : *Jnal Exp. Med.* (1955), 101, p. 25/41.
- (31) HINZ R.-W., SYVERTON J.-T. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1959), 101, p. 19/26.
- (32) HOLLAND J.-J., MC LAREN L.-C., SYVERTON J.-T. : *Fed. Proc.* (1959), 18, p. 573.
- (33) HOLPER J.-C., MARQUIS G.-S. : *Jnal Inf. Des.* (1955), 105 :3, p. 288/92.
- (34) HSIUNG G.-D., MELNICK J.-L. : *Jnal Imm.* (1958), 80, p. 282.
- (35) ISAACS A., LINDENMANN J. : *Proc. Roy. Soc., B.* (1957), 147, p. 258.
- (36) JOHNSON K.-M., MORGAN H.-R. : *Jnal Exp. Med.* (1956), 103, p. 765.
- (37) KAPLAN A.-S. : *Ann. Ny. Acad. Sci.* (1955), 61, p. 830.
- (38) KILBOURNE : *Jnal Inf. Des.* (1959), 38, p. 266.
- (39) MC LAREN L.-C., HOLLAND J.-J., SYVERTON J.-T. : *Jnal Exp. Med.* (1959), 109, p. 475.
- (40) LEPINE P., SLIZEWICZ P., DANIEL Ph., PACCAUD M. : *Ann. Inst. Past.* (1956), 90, p. 654.
- (41) LEVINTOW L., DARNELL J.-E. : *Fed. Proc.* (1959), 18, p. 273.
- (42) VON MAGNUS P. : *Adv. Vir. Res.* (1954), 2, p. 59.
- (43) MILLS : *Jnal Gen. Microbiol.* (1958), 19, p. 473.
- (44) MOGABGAB W.-J., GREEN I.-J., DIERKHISING O.-C. : *Science* (1954), 120, p. 320/321.
- (45) MOGABGAB W.-J., GREEN I.-J., DIERKHISING O.-C., PHILIPS I.-A. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1955), 89, p. 654/59.
- (46) MOGABGAB W.-J., SIMSON G.-L., GREEN I.-J. : *Jnal Imm.* (1956), 76, p. 314.
- (47) MOGABGAB W.-J., LIEBERMANN M., GREEN I.-J. : *Jnal Imm.* (1957), 78 p. 233/239.
- (48) MOLDAWSKI, GHENDON : *Acta Virol.* (1958), 2, p. 120/122.
- (49) MORGAN H.-R., BADER J.-P. : *Jnal Exp. Med.* (1957), 106, p. 39.
- (50) NEGRONI G., TYRRELL D.-A. : *Jnal Path. Bact.* (1959), 77, p. 497/504.
- (51) PAYNE F.-E., ACKERMANN W.W. : *Fed Proc.* (1958), 17, p. 529.
- (52) PELMONT J., MORGAN H.-R. : *Ann. Inst. Past.* (1959), 96, p. 448.

- (53) PIEZ K.-A., EAGLE H. : *Jnal Biol. Chem.* (1958), 231, p. 523.
 - (54) PAPPADOPOULOS C. : *Bull. World Health Organ* (1956), 14:1, p. 147/166.
 - (55) SILVERBERG P.-I., HABEL K., TAKEMOTO K.-K. : *Bact. Proc.* (1959), 76 p. 164.
 - (56) SCHIEF R., PHILLARD M.-M., GIBBERTI J., FREYDIER J. : *Ann. Biol. Clin.* (1956), 3-4, p. 281.
 - (57) STONE J.-D. : *Aust. Jnal Exp. Biol. Med. Sci.* (1948), 26, p. 49, p. 287.
 - (58) STULBERG C.-S., SHAPIRA : *Jnal Imm.* (1953), 70, p. 51.
 - (59) TAKEMOTO K.-K., LYNN P. K., HUERNER P. J., BILL J.-A., MELLIN C.-W. et DAVIS D.-J. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1955), 89.
 - (60) TAKEMOTO K.-K., HABEL K. : *Virology* (1959), 7, p. 28.
 - (61) TYRELL D.-A. : *Jnal Imm.* (1955), 74, p. 293.
 - (62) TYRELL D.-A. : *Nature* (1959), 184, p. 452/453.
 - (63) VEERAPACHARAN N., KIRTIKAR M.-W., SRIKESAVAN T. : *Bull. World Health Organ.* (1961), 24, p. 711/722.
 - (64) VOGT M.-R., DUBELCCO R., WENNER H.-A. : *Virology* (1957), 4, p. 141.
 - (65) *Virus virulence and pathogenicity*. Ciba Foundation Study.
 - (66) WAGNER R.-R. : *Proc. Exp. Biol.* (1955), 90, p. 214/217.
 - (67) WELLS K.-F., GUYER S.-M. : *Bull. Epiz. Africa Kenya* (1959), 7 : 3, p. 243.
 - (68) YOUNGNER J.-S. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1954), 85, p. 202.
 - (69) POCK T.-T., CROCHON S.-J. : *Symposium on latency and marking in viral and rickettsial infections*. Burgess. Minneapolis, p. 74.
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	21
PREMIERE PARTIE : Données bibliographiques	23
DEUXIEME PARTIE : Recherches personnelles	37
CHAPITRE I : Matériel et techniques utilisés	37
I. Cultures cellulaires	37
a) Réalisation des primocultures cellulaires	38
b) Réalisation des subcultures cellulaires	40
II. Virus grippal	41
III. Inoculation des cultures cellulaires	41
IV. Observation des cultures inoculées	41
CHAPITRE II : Résultats — Déroulement de l'adaptation	43
I. Primoculture	43
II. Subcultures	44
CHAPITRE III : Discussion	53
I. Rôle de la culture cellulaire dans l'adaptation de la souche de virus	53
Sensibilité et état réfractaire.	
Etat physiologique et nutrition.	
II. Rôle du virus	67
Adsorption.	
Interférence par virus incomplet et interféron.	
Sélection d'un variant.	
III. Applications pratiques	75
CONCLUSIONS	77
BIBLIOGRAPHIE	81

TABLE DES FIGURES

Tableau I	45
Tableau II	46
Tableau III	47
Tableau IV	58
Figure 1	48
Figure 2	73

